

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/FR05/000093

International filing date: 14 January 2005 (14.01.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: FR
Number: 0400366
Filing date: 15 January 2004 (15.01.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 30 March 2005 (30.03.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse



BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 20 JAN. 2005

Pour le Directeur général de l'Institut
national de la propriété industrielle
Le Chef du Département des brevets

Martine PLANCHE

INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE

SIEGE
26 bis, rue de Saint-Petersbourg
75800 PARIS cedex 08
Téléphone : 33 (0)1 53 04 53 04
Télécopie : 33 (0)1 53 04 45 23
www.inpi.fr

BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI



N° 11354*01

26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08
Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 94 86 54

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE 1/2

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 540 W / 260959

REMISE DES PIÈCES DATE 15 JAN 2004 LIEU 75 INPI PARIS 26Bis SP N° D'ENREGISTREMENT 0400366 NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI DATE DE DÉPÔT ATTRIBUÉE PAR L'INPI 15 JAN. 2004		1 NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE GROSSET-FOURNIER & DEMACHY 54, rue Saint-Lazare F-75009 Paris	
Vos références pour ce dossier (facultatif) IFB 03 DH INR ORUS			
Confirmation d'un dépôt par télécopie <input type="checkbox"/> N° attribué par l'INPI à la télécopie			
2 NATURE DE LA DEMANDE		Cochez l'une des 4 cases suivantes	
Demande de brevet		<input checked="" type="checkbox"/>	
Demande de certificat d'utilité		<input type="checkbox"/>	
Demande divisionnaire		<input type="checkbox"/>	
<i>Demande de brevet initiale</i> <i>ou demande de certificat d'utilité initiale</i>		N° _____ Date ____/____/____ N° _____ Date ____/____/____	
Transformation d'une demande de brevet européen <i>Demande de brevet initiale</i>		<input type="checkbox"/> N° _____ Date ____/____/____	
3 TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum) PROCEDE DE SURPRODUCTION D'UNE PROTEINE RECOMBINANTE DETERMINEE PAR DES SOUCHES MONOCARYOTIQUES DE P. CINNABARINUS			
4 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE FRANÇAISE		Pays ou organisation _____ N° _____ Date ____/____/____ Pays ou organisation _____ N° _____ Date ____/____/____ Pays ou organisation _____ N° _____ Date ____/____/____ <input type="checkbox"/> S'il y a d'autres priorités, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»	
5 DEMANDEUR		<input checked="" type="checkbox"/> S'il y a d'autres demandeurs, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»	
Nom ou dénomination sociale		INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE	
Prénoms			
Forme juridique			
N° SIREN			
Code APE-NAF			
Adresse	Rue	147, rue de l'Université	
	Code postal et ville		
Pays		F-75338 PARIS CEDEX 07	
Nationalité		FRANCE	
N° de téléphone (facultatif)		FRANCAISE	
N° de télécopie (facultatif)			
Adresse électronique (facultatif)			



BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE 2/2

REMISE DES PIÈCES DATE 15 JAN 2004 LIEU 75 INPI PARIS 26Bis SP N° D'ENREGISTREMENT 0400366 NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI		Réservé à l'INPI	08 540 W / 190600
Vos références pour ce dossier : <i>(facultatif)</i>		IFB 03 DH INR ORUS	
6 MANDATAIRE Nom Prénom Cabinet ou Société N° de pouvoir permanent et/ou de lien contractuel Adresse Rue Code postal et ville N° de téléphone <i>(facultatif)</i> N° de télécopie <i>(facultatif)</i> Adresse électronique <i>(facultatif)</i>		DEMACHY Charles GROSSET-FOURNIER & DEMACHY 54, rue Saint-Lazare 75009 PARIS 01.42.81.09.58 01.42.81.08.71	
7 INVENTEUR (S)		<input type="checkbox"/> Oui <input checked="" type="checkbox"/> Non Dans ce cas fournir une désignation d'inventeur(s) séparée	
8 RAPPORT DE RECHERCHE		Uniquement pour une demande de brevet (y compris division et transformation)	
Établissement immédiat ou établissement différé		<input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	
Paiement échelonné de la redevance		Paiement en deux versements, uniquement pour les personnes physiques <input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non	
9 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES		Uniquement pour les personnes physiques <input type="checkbox"/> Requête pour la première fois pour cette invention <i>(joindre un avis de non-imposition)</i> <input type="checkbox"/> Requête antérieurement à ce dépôt <i>(joindre une copie de la décision d'admission pour cette invention ou indiquer sa référence):</i>	
Si vous avez utilisé l'imprimé «Suite», indiquez le nombre de pages jointes			
10 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE <i>(ou en qualité de clerc de notaire)</i>		VISA DE LA PRÉFECTURE OU DE L'INPI	
Charles DEMACHY Mandataire GROSSET-FOURNIER & DEMACHY			

PROCEDE DE SURPRODUCTION D'UNE PROTEINE RECOMBINANTE
DETERMINEE PAR DES SOUCHES MONOCARYOTIQUES DE *P.*
CINNABARINUS

5

La présente invention concerne l'utilisation de souches monocaryotiques de champignons filamenteux de l'espèce *Pycnoporus* du groupe basidiomycète, pour la mise en oeuvre d'un procédé de préparation d'une protéine recombinante déterminée, ledit procédé étant effectué par surexpression du gène codant pour cette protéine dans la

10

A l'heure actuelle, deux modèles fongiques sont utilisés préférentiellement par les grands groupes industriels dans le cadre de la production d'enzymes intervenant dans les biotransformations végétales, telles que les métalloenzymes. Il s'agit d'*Aspergillus*, et de *Trichoderma*, qui appartiennent au groupe des deutéromycètes. Toutefois, les rendements de production à l'aide de ces modèles, notamment en production de laccases, n'excèdent pas les 150 mg/l.

15

La présente invention découle de la mise en évidence par les Inventeurs du fait que la transformation de souches monocaryotiques de *P. cinnabarinus* déficientes pour l'activité laccase à l'aide de vecteurs contenant le gène codant pour cette laccase et dont l'expression est sous le contrôle d'un promoteur identique au promoteur *pLac* endogène de la laccase de *P. cinnabarinus*, conduit à une production équivalente de laccase que lors de la mise en oeuvre d'un procédé de surproduction de laccase par induction du promoteur endogène de cette laccase par action de l'éthanol sur des souches monocaryotiques de *P. cinnabarinus* non déficientes pour l'activité laccase, et qui égale

20

25

Des résultats similaires ont été obtenus par les Inventeurs en utilisant le promoteur *gpd*, et le promoteur *sc3* de *Schizophyllum commune*, en lieu et place du promoteur *pLac* susmentionné.

La présente invention a pour objet un procédé de préparation d'une protéine recombinante déterminée, ledit procédé étant effectué par surexpression du gène codant pour cette protéine déterminée dans une souche monocaryotique de champignons filamenteux de l'espèce *Pycnoporus* du groupe basidiomycète, et notamment:

30

une souche de champignon filamentaire de la souche *Pycnoporus cinnabarinus* ou d'une souche de champignon filamentaire de la souche *Pycnoporus cinnabarinus* transformée par le gène codant pour la protéine déterminée.

contenant le gène codant pour la protéine recombinante déterminée, dont l'expression est placée sous le contrôle d'un promoteur correspondant à un promoteur endogène des champignons susmentionnés, ou d'un promoteur différent (encore désigné promoteur exogène), ledit promoteur étant constitutif ou inductible,

5 - le cas échéant une étape d'induction du promoteur susmentionné, lorsque celui-ci est inductible,

- la récupération, et, le cas échéant, la purification de la protéine recombinante déterminée, produite dans le milieu de culture.

10 L'invention a plus particulièrement pour objet un procédé tel que décrit ci-dessus, caractérisé en ce que la souche monocaryotique de *Pycnoporus* utilisée pour la surexpression du gène codant pour la protéine recombinante déterminée, est telle qu'obtenue par mise en culture de la souche dicaryotique d'origine à 30°C dans le noir pendant 15 jours, suivie d'une étape d'exposition au jour 2 à 3 semaines à température ambiante jusqu'à la formation d'organes de fructification correspondant à des hyphes différenciées appelées basides, au sein desquels a alors lieu la caryogamie (fusion des

15 noyaux), suivie de la méiose qui conduit à la formation de quatre spores sexuées, ou basidiospores haploïdes génétiquement différentes, qui, après germination, engendre un mycélium monocaryotique.

20 Avantageusement, la souche monocaryotique de *Pycnoporus* utilisée dans le procédé susmentionné de l'invention, est une souche de *Pycnoporus cinnabarinus*.

Les protéines recombinantes déterminées surexprimées dans le cadre de la mise en oeuvre du procédé selon l'invention, correspondent soit à des protéines endogènes de *Pycnoporus*, soit à des protéines exogènes différentes des protéines endogènes de *Pycnoporus*. Notamment ces protéines exogènes correspondent à des protéines

25 endogènes de basidiomycètes autres que *Pycnoporus*, telles que les enzymes basidiomycètes intervenant dans les biotransformations végétales.

L'invention a plus particulièrement pour objet un procédé tel que décrit ci-dessus, caractérisé en ce que les protéines les protéines recombinantes déterminées correspondent aux protéines endogènes de *Pycnoporus* suivantes :

30 - les métalloenzymes, telles que la laccase, ou la tyrosinase,
- ou la cellobiose déshydrogénase, la xylanase, la β -glycosidase, l'invertase, ou l' α -amylase.

Avantageusement, dans le cas de la préparation de protéines recombinantes déterminées correspondant aux protéines endogènes de *Pycnoporus*, la souche

monocaryotique de *Pycnoporus* utilisée est déficiente pour le gène codant pour la protéine endogène à laquelle correspond la protéine recombinante déterminée, afin de ne pas avoir à séparer la protéine recombinante déterminée de la protéine endogène à laquelle elle correspond lors de la purification de ladite protéine recombinante.

5 En variante, toujours dans le cas de la préparation de protéines recombinantes déterminées correspondant aux protéines endogènes de *Pycnoporus*, la souche monocaryotique de *Pycnoporus* utilisée peut ne pas être déficiente pour le gène codant pour la protéine endogène à laquelle correspond la protéine recombinante déterminée, ladite souche étant alors transformée à l'aide d'un vecteur d'expression contenant le gène
10 codant pour la protéine recombinante déterminée marquée afin de la distinguer de la protéine endogène lors de l'étape de purification. A titre d'illustration, la protéine recombinante déterminée peut être marquée par une étiquette histidine (His-tag).

A ce titre, l'invention a plus particulièrement pour objet un procédé de préparation de laccases recombinantes correspondant aux laccases endogènes de *Pycnoporus*,
15 caractérisé en ce qu'il comprend :

- une étape de mise en culture d'une souche monocaryotique de *Pycnoporus*, le cas échéant déficiente pour le gène codant pour la laccase endogène de *Pycnoporus*, transformée à l'aide d'un vecteur d'expression contenant le gène codant pour une laccase de *Pycnoporus*, le cas échéant marquée, et dont l'expression est placée sous le contrôle
20 d'un promoteur correspondant au promoteur endogène de cette laccase,

- une étape d'induction du promoteur susmentionné, notamment par addition d'éthanol, ou de sous-produits agricoles contenant de la lignocellulose comme la paille de blé, les sons de maïs et la pulpe de betterave, ou des composés à cycle aromatique comme la 2,5-xylidine, l'acide vératrylique, le guaïcol, l'alcool vératrylique, la
25 syringaldazine, l'acide férulique, l'acide caféique et les lignosulfonates,

- la récupération, et, le cas échéant, la purification de la laccase recombinante, le cas échéant marquée, correspondant à la laccase endogène de *Pycnoporus* susmentionnée produite dans le milieu de culture, notamment selon la méthode décrite dans Sigoillot J.C., Herpoel I., Frasse P., Moulkha S., Lesage-Meessen L., Asther M.
30 1999 : Laccase production by a monocaryotic strain *Pycnoporus chinabarkinus* derived from a dikaryotic strain : World Journal of Microbiology and Biotechnology 15: 681-684.

Pycnoporus cinnabarinus représentée par SEQ ID NO : 2, caractérisé en ce qu'il comprend :

- une étape de mise en culture d'une souche monocaryotique de *Pycnoporus cinnabarinus*, le cas échéant déficiente pour le gène codant pour la laccase endogène de *Pycnoporus cinnabarinus*, transformée à l'aide d'un vecteur d'expression contenant la séquence nucléotidique SEQ ID NO : 1 codant pour la laccase recombinante représentée par SEQ ID NO : 2, le cas échéant marquée, notamment par une étiquette His-tag, et dont l'expression est placée sous le contrôle du promoteur *pLac* correspondant au promoteur endogène de la laccase susmentionnée, la séquence dudit promoteur *pLac* étant représentée par SEQ ID NO : 3,

- une étape d'induction par l'éthanol du promoteur *pLac* susmentionné,
- la récupération, et, le cas échéant, la purification de la laccase recombinante, le cas échéant marquée, représentée par SEQ ID NO : 2 produite dans le milieu de culture, notamment selon la méthode décrite dans Sigoillot J.C., et al. (1999) susmentionné.

L'invention a plus particulièrement pour objet un procédé de préparation de laccases recombinantes correspondant aux laccases endogènes de *Pycnoporus*, caractérisé en ce qu'il comprend :

- une étape de mise en culture d'une souche monocaryotique de *Pycnoporus*, le cas échéant déficiente pour le gène codant pour la laccase endogène de *Pycnoporus*, transformée à l'aide d'un vecteur d'expression contenant le gène codant pour une laccase de *Pycnoporus* dont l'expression est placée sous le contrôle d'un promoteur exogène choisi parmi :

* le promoteur *gpd* de l'expression du gène codant pour la glycéraldéhyde 3-phosphate déhydrogénase de *Schizophyllum commune*, dont la séquence nucléotidique est représentée par SEQ ID NO : 4,

* ou le promoteur *sc3* de l'expression du gène codant pour l'hydrophobine de *Schizophyllum commune*, dont la séquence nucléotidique est représentée par SEQ ID NO : 5,

- la récupération, et, le cas échéant, la purification de la laccase recombinante correspondant à la laccase endogène de *Pycnoporus* susmentionnée produite dans le milieu de culture, notamment selon la méthode décrite dans Sigoillot J.C., et al. (1999) susmentionné.

L'invention concerne plus particulièrement un procédé tel que défini ci-dessus, de préparation de la laccase correspondant à la laccase endogène de *Pycnoporus cinnabarinus* représentée par SEQ ID NO : 2, caractérisé en ce qu'il comprend :

- une étape de mise en culture d'une souche monocaryotique de *Pycnoporus cinnabarinus*, le cas échéant déficiente pour le gène codant pour la laccase endogène de *Pycnoporus cinnabarinus*, transformée à l'aide d'un vecteur d'expression contenant la séquence nucléotidique SEQ ID NO : 1 codant pour la laccase recombinante représentée par SEQ ID NO : 2, le cas échéant marquée, notamment par une étiquette His-tag, dont l'expression est placée sous le contrôle du promoteur exogène *gpd* ou *sc3*,

- la récupération, et, le cas échéant, la purification de la laccase recombinante, le cas échéant marquée, représentée par SEQ ID NO : 2 produite dans le milieu de culture, notamment selon la méthode décrite dans Sigoillot J.C., et al. (1999) susmentionné.

L'invention a également pour objet la séquence nucléotidique codant pour le promoteur *pLac* de la laccase endogène de *Pycnoporus cinnabarinus*, et correspondant à la séquence SEQ ID NO : 3, ou toute séquence dérivée de ce promoteur par substitution, addition ou suppression d'un ou plusieurs nucléotides et conservant la propriété d'être un promoteur de l'expression de séquences.

L'invention concerne également tout vecteur d'expression, tel que le plasmide *pELP*, caractérisé en ce qu'il comprend la séquence SEQ ID NO : 3 du promoteur *pLac* susmentionné, ou une séquence dérivée telle que définie ci-dessus.

L'invention a plus particulièrement pour objet tout vecteur d'expression tel que défini ci-dessus, caractérisé en ce qu'il comprend un gène codant pour une protéine recombinante déterminée, et dont l'expression est placée sous le contrôle du promoteur *pLac* susmentionné, ou d'une séquence dérivée telle que définie ci-dessus.

L'invention concerne plus particulièrement tout vecteur d'expression tel que défini ci-dessus, caractérisé en ce que la protéine recombinante déterminée est une protéine correspondant à une protéine endogène de *Pycnoporus* choisie parmi les suivantes :

- les métalloenzymes, telles que la laccase, ou la tyrosinase,
- ou la cellobiose déshydrogénase, la xylanase, la β -glycosidase, l'invertase, ou l' α -amylase.

L'invention concerne également toute cellule hôte transformée à l'aide d'un vecteur d'expression tel que défini ci-dessus.

L'invention a plus particulièrement pour objet toute cellule hôte susmentionnée, correspondant à des cellules monocaryotiques de souches de *Pycnoporus*, telles que les souches de *Pycnoporus cinnabarinus*.

5 L'invention a également pour objet l'utilisation de vecteurs d'expression tels que définis ci-dessus, ou de cellules hôtes susmentionnées, pour la mise en oeuvre d'un procédé de surproduction d'une protéine recombinante déterminée telle que définie ci-dessus.

10 L'invention sera davantage illustrée à l'aide de la description détaillée qui suit du SEPC : Système d'Expression *Pycnoporus cinnabarinus*, à savoir du développement d'un modèle d'expression fongique performant permettant de s'affranchir des modèles industriels utilisés actuellement par les grands groupes européens (*Aspergillus* et *Trichoderma*).

15 En résumé, il s'agit d'un système d'expression eucaryote et plus spécifiquement de champignon filamenteux du groupe basidiomycète, *Pycnoporus cinnabarinus*, qui a été développé par les Inventeurs pour la surexpression de protéines d'intérêt industriel. Ce travail a été fait dans le cadre de l'étude de métalloenzymes, telles que les laccases, et en particulier a permis de cloner les gènes impliqués pour leur surexpression, et de surproduction des laccases en grande quantité à l'aide de fermenteurs, ceci afin de les
20 utiliser dans des applications industrielles à usage alimentaire (panification, préparation de boissons afin de moduler la couleur du thé, aider à la clarification des jus de fruits et des boissons alcoolisées, formation d'agropolymères) et non alimentaire (traitement des « jeans », dégradation de polluants aromatiques dans les sols, bioblanchiment des fibres lignocellulosiques dans le domaine des pâtes à papier).

25 **I) Obtention de lignées monocaryotiques de *Pycnoporus cinnabarinus* pour la transformation du champignon et la surproduction de gènes d'intérêt.**

30 Cette étape a pour but d'isoler puis de sélectionner des lignées cellulaires haploïdes issues des spores sexuées d'un champignon filamenteux, *Pycnoporus cinnabarinus*, qui seront utilisées en temps qu'hôte pour l'expression des gènes d'intérêt. *P. cinnabarinus* est un champignon hétérothallique qui se trouve à l'état sauvage sous forme dicaryotique (deux noyaux non appariés par cellule) à partir duquel des lignées monocaryotiques sont sélectionnées (un noyau par cellule), potentiellement plus stable et donc utilisable pour la transformation génétique. Dans le cadre de cette

étude les Inventeurs se sont attachés à sélectionner de lignées monocaryotiques déficientes pour l'activité laccase (lac). A l'état dicaryotique, le champignon peut se multiplier par voie végétative (Fig. 1). Mais, sous l'influence de conditions environnementales particulières, on peut induire, en laboratoire, la formation d'organes de fructification. Au sein d'hyphes différenciées appelées basides, a alors lieu la caryogamie (fusion des noyaux), suivie de la méiose qui conduit à la formation de quatre spores sexuées, ou basidiospores haploïdes génétiquement différentes. Après germination, chaque basidiospore engendre un mycélium monocaryotique. Un simple test colorimétrique permet ensuite de ne sélectionner que les souches dépourvues d'activité laccase.

1) Isolement des souches monocaryotiques

Le milieu de fructification est composé d'extrait de malt 2% (P/V) et de l'agar (1,6% P/V). Les cultures sontensemencées dans des boîtes de Pétri et gardées à 30°C dans le noir pendant 15 jours avant de les exposer au jour 2 à 3 semaines à température ambiante. Le corps de fructification apparaît orange-rouge. Les monospores sont alors récoltées avec de l'eau stérile sur le couvercle de la boîte de Pétri. La suspension est diluée et mise en culture dans des boîtes de Pétri contenant un milieu MA2 (malt 2% P/V et agar 2% P/V) dans le but d'isoler des colonies. Des cultures pures isolées sont piquées et gardées dans du milieu MA2 à 30°C pendant 5 jours et stockées à 4°C.

Dans ces conditions, une souche monocaryotique déficiente pour l'activité laccase a été sélectionnée pour la transformation avec le vecteur d'expression dans le but de surexprimer le gène de la laccase. Une étude en Southern blot a été effectuée et a permis de démontrer que cette souche est déficiente pour le gène codant pour la laccase chez *P. cinnabarinus*.

2) Test rapide de détection de l'activité laccase des colonies monospores

Un morceau de mycélium est déposé dans une boîte de Petri et recouvert d'une goutte de syringaldazine 0,1% (P/V) en solution éthanolique ; Après 15 minutes, un changement de couleur est observé. Le 2,2-azino-bis-[3-éthylthiazoline-6-sulfonate] (ABTS) peut être utilisé également comme substrat pour révéler une activité laccase.

3) Conditions de cultures pour produire la laccase

Un inoculum est prélevé des précultures qui ont poussé 10 jours à 30°C dans des fioles de Roux contenant 200 mL d'un milieu synthétique avec la composition suivante pour 1L : maltose (20 g), tartrate de diammonium (1,84 g), tartrate de disodium (2,3 g),
5 KH_2PO_4 (1,33 g), CaCl_2 , H_2O (0,1 g), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,5 g), $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,07 g),
 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,046 g), $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (0,035 g), $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0,1 g), extrait de levure
(1 g), solution de vitamines (1 mL/L) selon Tatum et al. (Biochemical mutant strains of
Neurospora produced by physical and chemical treatment. American Journal of Botany,
10 37 : 38-46, 1950). Le mycélium de deux fioles est collecté, mélangé à 100 mL d'eau
stérile et broyés au mixeur Ultraturax 60 sec. Pour produire de la laccase, le milieu
synthétique est inoculé par 1 mL de la suspension de mycélium. Le milieu (100 mL) est
ensuite incubé à 30°C dans des fioles erlenmeyer bafflées de 250 mL sous agitation
(120 rpm).°

15 II) Clonage du gène codant pour la laccase de *Pycnoporus cinnabarinus* et de son promoteur en vue de la construction d'un vecteur d'expression

Il s'agit d'un système d'expression eucaryote et plus particulièrement de
champignon filamenteux, *Pycnoporus cinnabarinus*, du groupe basidiomycète pour la
20 surproduction de protéines recombinantes déterminées. Le modèle d'étude sélectionné
est celui de la laccase de *P. cinnabarinus*. A l'heure actuelle, deux modèles fongiques
sont utilisés préférentiellement par les grands groupes industriels. Il s'agit d'*Aspergillus*
et de *Trichoderma* qui appartiennent au groupe des Deutéromycètes. Ce système
d'expression est donc tout à fait original et devrait combler la lacune concernant le
25 développement de système d'expression basidiomycète compatible avec les exigences
des industriels (possibilité de production à grande échelle de protéines sécrétées dans le
milieu extra-cellulaire et culture du champignon producteur en fermenteur).

30 1) Clonage de gène de la laccase de *Pycnoporus cinnabarinus* et de son promoteur

Dans une première étape, les Inventeurs ont amplifié un fragment du gène codant
pour la laccase à l'aide d'amorces nucléotidiques dégénérées (Fig. 2). Les amorces
dégénérées amont F2 (SEQ ID NO : 6 ; CAYTGGCAYGGRTTCTTCC) et aval R8
(SEQ ID NO : 7 ; GAGRTGGAAGTCRATGTGRC) ont été déduites, respectivement ,

des régions de liaison au cuivre I et IV des laccases d'organismes voisins et utilisées dans une réaction de PCR (Polymerase Chain Reaction) en utilisant l'ADN génomique de *P. cinnabarinus* I-937. A 10 µl de mélange réactionnel sont ajoutés : 100 ng d'ADN génomique; 0.2 mM de dATP, dCTP, dTTP, and dGTP; 25 pmol de chaque amorce nucléotidique; 0.1 volume de tampon 10X *Pfu* polymerase (100 mM Tris-HCl, 15mM MgCl₂, 500 mM KCl, pH 8,3) and 1 U de polymerase *Pfu*. Le mélange est chauffé à 94°C pendant 5 min avant d'ajouter la polymérase. Les conditions de la réaction sont les suivantes : 5 cycles de 94 °C, 5 min; 55 °C, 30 s; et 72 °C, 4 min; puis 25 cycles of 94 °C, 30 s; 55 °C, 30 s, et 72 °C, 3 min. Une étape de 10 min à 72°C est effectuée afin de finir la réaction. Une bande de 1,64 kpb a été obtenue correspondant à la partie centrale du gène de la laccase. La séquence ADN a été clonée dans pGEM-T afin de séquencer cette partie du gène.

Par une technique de Southern blot (Fig. 3), nous avons défini les sites de restriction appropriés afin d'obtenir un fragment d'ADN minimum, pouvant contenir l'intégralité de gène de la laccase, et qui sont susceptibles de servir à amplifier les extrémités 5' et 3' manquantes. Un Southern blot a été effectué avec l'ADN génomique de *P. cinnabarinus* avec les enzymes, *Bam*HI, *Eco*RI, *Pst*I, *Pvu*II, *Sac*I, *Sma*I and *Xba* I et a permis de sélectionner *Pst*I qui donne une bande de 3.5 kpb par digestion de l'ADN génomique. Afin d'amplifier les parties manquantes du gène, une technique de PCR inverse a été utilisée avec un mélange de PCR contenant des amorces nucléotidiques spécifiques de la partie centrale précédemment isolée et de l'ADN génomique de *P. cinnabarinus*. La réaction de PCR est effectuée avec 150 ng d'ADN coupé par *Pst*I et recircularisé sur lui-même par ligation et les amorces nucléotidiques Fex (SEQ ID NO : 8 ; GGATAACTACTGGATCCGCG) et Rex (SEQ ID NO : 9 ; CGCAGTATTGCGTGGAGAG). Les conditions de la réaction sont les suivantes : 5 cycles de 94 °C, 5 min; 55 °C, 30 s; et 72 °C, 5 min; puis 25 cycles of 94 °C, 30 s; 55 °C, 30 s, et 72 °C, 4 min avec une étape finale de 10 min à 72 °C. Le fragment d'ADN amplifié correspond à une bande de 2,7 kpb qui a été cloné dans pGEM-T et séquencé.

L'intégralité du gène codant pour la laccase a été ensuite définie en combinant la partie centrale et les parties 5' et 3' amplifiées. Afin de vérifier cette séquence, le fragment de gène a été amplifié avec les amorces nucléotidiques

P. cinnabarinus. Ce gène a été également cloné à partir de l'ADN génomique de *P. cinnabarinus* ss3 et s'est avéré être identique à celui isolé chez *P. cinnabarinus* I-937.

5 2) *Construction du vecteur d'expression utilisant le promoteur du gène de la laccase*

10 A partir de la séquence du gène de la laccase, les Inventeurs ont cloné le promoteur de ce gène en utilisant la même stratégie employée précédemment pour l'isolement du gène, c'est-à-dire avec une technique de PCR inverse sur un fragment d'ADN génomique (3,5 kpb) coupé cette fois-ci par l'enzyme de restriction *Bgl*III (Fig. 5). Deux mille cinq cent vingt sept kpb en avant du gène de la laccase ont été ainsi cloné par PCR inverse et séquencé. Ce promoteur a été placé dans un vecteur une résistance à l'ampicilline pour son sous-clonage dans la bactérie et une résistance à la phléomycine utilisé comme marqueur de sélection dans le champignon. Un terminateur du gène
15 codant pour l'hydrophobine sc3 de *Schizophyllum commune* a été placé en aval afin de terminer l'étape de transcription. Ce vecteur appelé pELP sera utilisé pour l'expression homologue de la laccase (Fig. 6). Deux autres promoteurs hétérologues ont été utilisés dans cette étude. Ce sont les promoteurs des gènes codant pour la glyceraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase (*gpd*) et l'hydrophobine (*sc3*) de *Schizophyllum commune* (Fig. 6), constituant respectivement les vecteurs d'expression pEGT et pESC.
20 L'intégralité des séquences nucléotidiques de vecteurs pEGT (SEQ ID NO : 12), pESC (SEQ ID NO : 13), et pELP (SEQ ID NO : 14), se trouvent dans les figures 7, 8 et 9 avec les positions du promoteur, du marqueur de sélection et du terminateur.

25 III) *Transformation de la souche monocaryotique avec les vecteurs d'expression (modèle d'étude : la laccase de *Pycnoporus cinnabarinus*)*

 1) *Préparation du mycélium pour l'obtention de protoplastes*

30 Un quart d'une colonie cultivée en milieu solide (10 jours) est homogénéisé avec un mixeur (type Ultraturax, vitesse lente) pendant une minute dans 50 ml de milieu YM (par litre : glucose 10 g, peptone 5 g, extrait de levure 3 g, extrait de malt 3 g). Le broyat est transféré dans un erlenmeyer de 250 ml stérile où l'on rajoute 50 ml de milieu YM, puis incubé à 30°C et sous agitation (225 rpm) pendant 20 heures. La culture est une nouvelle fois homogénéisée pendant 1 min (vitesse lente) et on rajoute 100 ml de

milieu YM. Le broyat est transféré dans un erlenmeyer de 500 ml et mis en culture pendant une nuit à 30°C.

2) Préparation des protoplastes

5 La culture de champignon est centrifugée pendant 10 min à 2000 rpm dans un rotor oscillant (tube de 50 ml). Seize g (poids humide) sont lavés dans 40 ml d'une solution de MgSO_4 0,5 M ou de saccharose 0,5 M. Dans le cas de l'utilisation du saccharose, l'enzyme lytique utilisée pour digérer les parois est diluée dans le saccharose. Le mycélium est ensuite centrifugé 10 min à 2000 rpm et le surnageant
10 éliminé. Concernant la lyse des parois fongiques, on ajoute au mycélium provenant de 50 ml de culture, 10 ml d'enzyme lytique (Glucanex, Sigma) dilué à 1 mg/ml dans une solution de MgSO_4 0,5 M. La digestion se fait dans un erlenmeyer de 500 ml à 30°C sous faible agitation pendant 3 à 4 heures. Pendant cette incubation, l'apparition des protoplastes est contrôlée au microscope. Dix ml d'eau stérile sont rajoutés, puis
15 mélangés délicatement. Les protoplastes sont laissés 10 min, le temps que l'équilibre avec l'eau se fasse (les protoplastes vont flotter à la surface). Ils sont ensuite centrifugés 10 min à 2000 rpm dans un rotor oscillant. Le surnageant contenant les protoplastes est transféré délicatement dans un nouveau de 50 ml. Le culot restant peut-être re-incubé avec 25 ml d'une solution de MgSO_4 0,5M pour récupérer le maximum de protoplastes
20 (on répète alors l'étape de centrifugation). Un volume de sorbitol 1 M, égal à celui de la préparation des protoplastes, lui est rajouté. Pendant 10 min, on laisse les protoplastes relarguer l'eau. Cette préparation est ensuite centrifugée 10 min à 2000 rpm. Le surnageant est éliminé, tout en laissant un peu de sorbitol. Les protoplastes sont transférés dans un nouveau tube. Le précédent tube est rincé avec la solution de sorbitol
25 1M et les protoplastes récupérés, ajoutés dans le nouveau tube. Les protoplastes sont comptés et centrifugés 10 min à 2000 rpm. Ils sont ensuite dilués à une concentration de $2 \cdot 10^7$ protoplastes par ml dans la solution de sorbitol 1M. Une solution de CaCl_2 à 0,5 M (1/10) est rajoutée aux protoplastes.

3) Transformation des protoplastes

30 Pour la transformation, 100 µl de protoplastes sont transformés avec 5 à 10 µg de matériel génétique. Le matériel génétique est ajouté dans un volume de 10 µl de solution de sorbitol 1M. La transformation est réalisée dans un volume de 100 µl de solution de sorbitol 1M. La transformation est réalisée dans un volume de 100 µl de solution de sorbitol 1M. La transformation est réalisée dans un volume de 100 µl de solution de sorbitol 1M.

Deux et demi ml de milieu de régénération (pour 100 ml : glucose 2 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 12,5 g, KH_2PO_4 0,046 g, K_2HPO_4 0,1 g, bacto peptone 0,2 g, extrait de levure 0,2 g) sont rajoutés aux protoplastes qui sont incubés une nuit à 30°C. Des boîtes de sélection (milieu YM contenant de la phléomycine à 7 $\mu\text{g/ml}$, boîtes carrées) sont préchauffées à 37°C. Sept et demi ml d'un mélange de top agar (Low Melting Point agarose 1% dilué dans un milieu YM contenant de la phléomycine 7 à 10 $\mu\text{g/ml}$) sont ajoutés au milieu de régénération contenant les protoplastes et sont versés sur les boîtes de sélection préchauffées. Quand la solution de top agar s'est solidifiée, les boîtes sont incubées à 30°C pendant 4 jours. Les transformants sont alors transférés sur de nouvelles boîtes de sélection.

4) Ciblage des transformants

A partir de 16 g de mycélium, on obtient généralement de l'ordre de 1 à $2 \cdot 10^7$ protoplastes. Le pourcentage de régénération est de 10 %. Concernant le vecteur pESC, les monokaryons ont été transformés avec le vecteur contenant le cDNA (BRFM 472, 473 et 474) ou le gène codant pour la laccase de *P. cinnabarinus* (BRFM 470 et 471) (Fig. 10). En parallèle, d'autres monokaryons ont été transformés avec les promoteurs pEGT (GPD11, 12 et 13) ou avec le vecteur pELP (12.3, 12.7 et 12.8) contenant le gène codant pour la laccase (Fig. 10). Au vu des résultats deux transformants se dégagent du lot avec des activités équivalentes, les transformants 12.7 et GPD14. L'activité au cours du temps a été suivie pour les transformants GPD14 et 12.7 (Fig. 11). L'activité est détectable à partir de 3-4 jours et augmentent jusqu'à 12 jours pour atteindre approximativement 1200 nkatal/ml soit 72000 U/l avec ajout d'éthanol dans le milieu de culture.

Légende des figures

Figure 1 : Isolement de souche monokaryotique déficiente pour l'activité laccase.

Figure 2 : Isolement du gène codant pour la laccase de *Pycnoporus cinnabarinus* laccase.

Figure 3 : Etude en Southern blot du gène codant pour la laccase de *Pycnoporus cinnabarinus*.

Figure 4 : Séquence du gène codant pour la laccase de *Pycnoporus cinnabarinus*.

5 **Figure 5 :** Séquence de la séquence promotrice pLac du gène codant pour la laccase de *Pycnoporus cinnabarinus* (jusqu'à l'ATG codant pour la méthionine de la laccase).

10 **Figure 6 :** Carte physique des trois vecteurs d'expression pEGT, pESC, pELP, utilisés pour la production de la laccase chez *Pycnoporus cinnabarinus*.

Figure 7 : Séquence nucléotidique du vecteur pEGT, contenant le promoteur du gène *gpd* (4480-5112), un marqueur de résistance à la phléomycine (507-1822) et le terminateur du gène *sc3* (71-507).

15 **Figure 8 :** Séquence nucléotidique du vecteur pESC, contenant le promoteur du gène *sc3* (1-1033), un marqueur de résistance à la phléomycine (1540-2855) et le terminateur du gène *sc3* (1104-1540).

20 **Figure 9 :** Séquence nucléotidique du vecteur pELP, contenant le promoteur du gène laccase (4457-6983), un marqueur de résistance à la phléomycine (507-1822) et le terminateur du gène *sc3* (71-507)

Figure 10 : Résultats de production des transformants présentant les activités les plus importantes. La culture a été effectuée avec ou sans (témoin) éthanol.

25 **Figure 11 :** Suivi des activités laccase des transformants GPD 14 et 12.7 en fonction du temps avec ou (témoin) sans éthanol.

REVENDECATIONS

5 1. Procédé de préparation d'une protéine recombinante déterminée, ledit procédé étant effectué par surexpression du gène codant pour cette protéine déterminée dans une souche monocaryotique de champignons filamenteux de l'espèce *Pycnoporus* du groupe basidiomycète, et comprend :

10 - une étape de mise en culture de la souche monocaryotique de *Pycnoporus* susmentionnée, ladite souche étant transformée à l'aide d'un vecteur d'expression contenant le gène codant pour la protéine recombinante déterminée, dont l'expression est placée sous le contrôle d'un promoteur correspondant à un promoteur endogène des champignons susmentionnés, ou d'un promoteur différent (encore désigné promoteur exogène), ledit promoteur étant constitutif ou inductible,

15 - le cas échéant une étape d'induction du promoteur susmentionné, lorsque celui-ci est inductible,

- la récupération, et, le cas échéant, la purification de la protéine recombinante déterminée, produite dans le milieu de culture.

20 2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que la souche monocaryotique de *Pycnoporus* utilisée pour la surexpression du gène codant pour la protéine recombinante déterminée est telle qu'obtenue par mise en culture de la souche dicaryotique d'origine à 30°C dans le noir pendant 15 jours, suivie d'une étape d'exposition au jour 2 à 3 semaines à température ambiante jusqu'à la formation d'organes de fructification correspondant à des hyphes différenciées appelées basides, 25 au sein desquels a alors lieu la caryogamie, suivie de la méiose qui conduit à la formation de quatre spores sexuées, ou basidiospores haploïdes génétiquement différentes, qui, après germination, engendre un mycélium monocaryotique.

30 3. Procédé selon la revendication 1 ou 2, caractérisé en ce que la souche monocaryotique de *Pycnoporus* utilisée est une souche de *Pycnoporus cinnabarinus*.

Le présent document est une copie non officielle de la publication internationale déposée par l'Institut National de la Santé et de la Sécurité au Travail (INSSST) à l'Office canadien de la propriété intellectuelle (OAPI) le 10/07/04.

correspondant à des protéines endogènes de basidiomycètes autres que *Pycnoporus*, telles que les enzymes basidiomycètes intervenant dans les biotransformations végétales.

5 5. Procédé selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que les protéines recombinantes déterminées correspondent aux protéines endogènes de *Pycnoporus* suivantes :

- les métalloenzymes, telles que la laccase, ou la tyrosinase,
 - ou la cellobiose déshydrogénase, la xylanase, la β -glycosidase, l'invertase, ou l' α -amylase.
- 10

6. Procédé selon l'une des revendications 1 à 5, de préparation de protéines recombinantes déterminées correspondant aux protéines endogènes de *Pycnoporus*, caractérisé en ce que la souche monocaryotique de *Pycnoporus* utilisée est déficiente pour le gène codant pour la protéine endogène à laquelle correspond la protéine recombinante déterminée..

15

7. Procédé selon l'une des revendications 1 à 6, de préparation de protéines recombinantes déterminées correspondant aux protéines endogènes de *Pycnoporus*, caractérisé en ce que la souche monocaryotique de *Pycnoporus* utilisée est transformée à l'aide d'un vecteur d'expression contenant le gène codant pour la protéine recombinante déterminée marquée, notamment par un marqueur histidine.

20

8. Procédé selon l'une des revendications 1 à 7, de préparation de laccases recombinantes correspondant aux laccases endogènes de *Pycnoporus*, caractérisé en ce qu'il comprend :

25

- une étape de mise en culture d'une souche monocaryotique de *Pycnoporus*, le cas échéant déficiente pour le gène codant pour la laccase endogène de *Pycnoporus*, transformée à l'aide d'un vecteur d'expression contenant le gène codant pour une laccase de *Pycnoporus*, le cas échéant marquée, et dont l'expression est placée sous le contrôle d'un promoteur correspondant au promoteur endogène de cette laccase,
 - une étape d'induction du promoteur susmentionné, notamment par addition d'éthanol, ou de sous-produits agricoles contenant de la lignocellulose comme la paille de blé, les sons de maïs et la pulpe de betterave, ou des composés à cycle aromatique
- 30

correspondant à des protéines endogènes de basidiomycètes autres que *Pycnoporus*, telles que les enzymes basidiomycètes intervenant dans les biotransformations végétales.

5 5. Procédé selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que les protéines recombinantes déterminées correspondent aux protéines endogènes de *Pycnoporus* suivantes :

- les métalloenzymes, telles que la laccase, ou la tyrosinase,
 - ou la cellobiose déshydrogénase, la xylanase, la β -glycosidase, l'invertase, ou
- 10 l' α -amylase.

6. Procédé selon l'une des revendications 1 à 5, de préparation de protéines recombinantes déterminées correspondant aux protéines endogènes de *Pycnoporus*, caractérisé en ce que la souche monocaryotique de *Pycnoporus* utilisée est déficiente

15 pour le gène codant pour la protéine endogène à laquelle correspond la protéine recombinante déterminée.

7. Procédé selon l'une des revendications 1 à 6, de préparation de protéines recombinantes déterminées correspondant aux protéines endogènes de *Pycnoporus*, caractérisé en ce que la souche monocaryotique de *Pycnoporus* utilisée est transformée

20 à l'aide d'un vecteur d'expression contenant le gène codant pour la protéine recombinante déterminée marquée, notamment par un marqueur histidine.

8. Procédé selon l'une des revendications 1 à 7, de préparation de laccases recombinantes correspondant aux laccases endogènes de *Pycnoporus*, caractérisé en ce qu'il comprend :

25

- une étape de mise en culture d'une souche monocaryotique de *Pycnoporus*, le cas échéant déficiente pour le gène codant pour la laccase endogène de *Pycnoporus*, transformée à l'aide d'un vecteur d'expression contenant le gène codant pour une laccase
- 30 de *Pycnoporus*, le cas échéant marquée, et dont l'expression est placée sous le contrôle d'un promoteur correspondant au promoteur du gène de cette laccase.

9. Procédé selon l'une des revendications 1 à 8, de préparation de laccases recombinantes correspondant aux laccases endogènes de *Pycnoporus*, caractérisé en ce qu'il comprend :

- une étape de mise en culture d'une souche monocaryotique de *Pycnoporus*, le cas échéant déficiente pour le gène codant pour la laccase endogène de *Pycnoporus*, transformée à l'aide d'un vecteur d'expression contenant le gène codant pour une laccase de *Pycnoporus*, le cas échéant marquée, et dont l'expression est placée sous le contrôle d'un promoteur correspondant au promoteur du gène de cette laccase.

comme la 2,5-xylidine, l'acide vératrylique, le guaïcol, l'alcool vératrylique, la syringaldazine, l'acide férulique, l'acide caféique et les lignosulfonates,

- la récupération, et, le cas échéant, la purification de la laccase recombinante, le cas échéant marquée, correspondant à la laccase endogène de *Pycnoporus* susmentionnée produite dans le milieu de culture.

9. Procédé selon la revendication 8, de préparation de la laccase recombinante correspondant à la laccase endogène de *Pycnoporus cinnabarinus* représentée par SEQ ID NO : 2, caractérisé en ce qu'il comprend :

- une étape de mise en culture d'une souche monocaryotique de *Pycnoporus cinnabarinus*, le cas échéant déficiente pour le gène codant pour la laccase endogène de *Pycnoporus cinnabarinus*, transformée à l'aide d'un vecteur d'expression contenant la séquence nucléotidique SEQ ID NO : 1 codant pour la laccase recombinante représentée par SEQ ID NO : 2, le cas échéant marquée, et dont l'expression est placée sous le contrôle du promoteur *pLac* correspondant au promoteur endogène de la laccase susmentionnée, la séquence dudit promoteur *pLac* étant représentée par SEQ ID NO : 3,
- une étape d'induction par l'éthanol du promoteur *pLac* susmentionné,
- la récupération, et, le cas échéant, la purification de la laccase recombinante, le cas échéant marquée, représentée par SEQ ID NO : 2 produite dans le milieu de culture.

8. Procédé de préparation de laccases recombinantes correspondant aux laccases endogènes de *Pycnoporus* selon la revendication 5, caractérisé en ce qu'il comprend :

- une étape de mise en culture d'une souche monocaryotique de *Pycnoporus*, le cas échéant déficiente pour le gène codant pour la laccase endogène de *Pycnoporus*, transformée à l'aide d'un vecteur d'expression contenant le gène codant pour une laccase de *Pycnoporus*, le cas échéant marquée, et dont l'expression est placée sous le contrôle d'un promoteur exogène choisi parmi :

- * le promoteur *gpd* de l'expression du gène codant pour la glyceraldéhyde 3-phosphate déhydrogénase de *Schizophyllum commune*, dont la séquence nucléotidique est représentée par SEQ ID NO : 4,

- * ou le promoteur *sc3* de l'expression du gène codant pour l'hydrophobine de *Schizophyllum commune*, dont la séquence nucléotidique est représentée par SEQ ID NO : 5,

comme la 2,5-xylidine, l'acide vératrylique, le guaïcol, l'alcool vératrylique, la syringaldazine, l'acide férulique, l'acide caféique et les lignosulfonates,

- la récupération, et, le cas échéant, la purification de la laccase recombinante, le cas échéant marquée, correspondant à la laccase endogène de *Pycnoporus* susmentionnée produite dans le milieu de culture.

9. Procédé selon la revendication 8, de préparation de la laccase recombinante correspondant à la laccase endogène de *Pycnoporus cinnabarinus* représentée par SEQ ID NO : 2, caractérisé en ce qu'il comprend :

- une étape de mise en culture d'une souche monocaryotique de *Pycnoporus cinnabarinus*, le cas échéant déficiente pour le gène codant pour la laccase endogène de *Pycnoporus cinnabarinus*, transformée à l'aide d'un vecteur d'expression contenant la séquence nucléotidique SEQ ID NO : 1 codant pour la laccase recombinante représentée par SEQ ID NO : 2, le cas échéant marquée, et dont l'expression est placée sous le contrôle du promoteur *pLac* correspondant au promoteur endogène de la laccase susmentionnée, la séquence dudit promoteur *pLac* étant représentée par SEQ ID NO : 3,

- une étape d'induction par l'éthanol du promoteur *pLac* susmentionné,

- la récupération, et, le cas échéant, la purification de la laccase recombinante, le cas échéant marquée, représentée par SEQ ID NO : 2 produite dans le milieu de culture.

10. Procédé selon l'une des revendications 1 à 7, de préparation de laccases recombinantes correspondant aux laccases endogènes de *Pycnoporus*, caractérisé en ce qu'il comprend :

- une étape de mise en culture d'une souche monocaryotique de *Pycnoporus*, le cas échéant déficiente pour le gène codant pour la laccase endogène de *Pycnoporus*, transformée à l'aide d'un vecteur d'expression contenant le gène codant pour une laccase de *Pycnoporus*, le cas échéant marquée, et dont l'expression est placée sous le contrôle d'un promoteur exogène choisi parmi :

* le promoteur *gpd* de l'expression du gène codant pour la glyceraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase de *Schizothyllum commune*, dont la séquence nucléotidique est représentée par SEQ ID NO : 4.

11. Procédé selon l'une des revendications 1 à 7, de préparation de laccases recombinantes correspondant aux laccases endogènes de *Pycnoporus*, caractérisé en ce qu'il comprend :

- la récupération, et, le cas échéant, la purification de la laccase recombinante, le cas échéant marquée, correspondant à la laccase endogène de *Pycnoporus* susmentionnée produite dans le milieu de culture.

5 9. Procédé selon la revendication 8, de préparation de la laccase recombinante correspondant à la laccase endogène de *Pycnoporus cinnabarinus* représentée par SEQ ID NO : 2, caractérisé en ce qu'il comprend :

10 - une étape de mise en culture d'une souche monocaryotique de *Pycnoporus cinnabarinus*, le cas échéant déficiente pour le gène codant pour la laccase endogène de *Pycnoporus*, transformée à l'aide d'un vecteur d'expression contenant la séquence nucléotidique SEQ ID NO : 1 codant pour la laccase recombinante représentée par SEQ ID NO : 2 le cas échéant marquée, et dont l'expression est placée sous le contrôle du promoteur exogène *gpd* ou *sc3*,

15 - la récupération, et, le cas échéant, la purification de la laccase recombinante, le cas échéant marquée, représentée par SEQ ID NO : 2 produite dans le milieu de culture.

20 10. Séquence nucléotidique codant pour le promoteur *pLac* de la laccase endogène de *Pycnoporus cinnabarinus*, et correspondant à la séquence SEQ ID NO : 3, ou toute séquence dérivée de ce promoteur par substitution, addition ou suppression d'un ou plusieurs nucléotides et conservant la propriété d'être un promoteur de l'expression de séquences.

25 11. Vecteur d'expression, tel que le plasmide *pELP*, caractérisé en ce qu'il comprend la séquence SEQ ID NO : 3 du promoteur *pLac* selon la revendication 10.

12. Vecteur d'expression selon la revendication 11, caractérisé en ce qu'il comprend un gène codant pour une protéine recombinante déterminée, et dont l'expression est placée sous le contrôle du promoteur *pLac* selon la revendication 11.

30 13. Vecteur d'expression selon la revendication 11 ou 12, caractérisé en ce que la protéine recombinante déterminée est une protéine correspondant à une protéine endogène de *Pycnoporus* choisie parmi les suivantes :

- les métalloenzymes, telles que la laccase, ou la tyrosinase,

- la récupération, et, le cas échéant, la purification de la laccase recombinante, le cas échéant marquée, correspondant à la laccase endogène de *Pycnoporus* susmentionnée produite dans le milieu de culture.

5 11. Procédé selon la revendication 10, de préparation de la laccase recombinante correspondant à la laccase endogène de *Pycnoporus cinnabarinus* représentée par SEQ ID NO : 2, caractérisé en ce qu'il comprend :

10 - une étape de mise en culture d'une souche monocaryotique de *Pycnoporus cinnabarinus*, le cas échéant déficiente pour le gène codant pour la laccase endogène de *Pycnoporus*, transformée à l'aide d'un vecteur d'expression contenant la séquence nucléotidique SEQ ID NO : 1 codant pour la laccase recombinante représentée par SEQ ID NO : 2 le cas échéant marquée, et dont l'expression est placée sous le contrôle du promoteur exogène *gpd* ou *sc3*,

15 - la récupération, et, le cas échéant, la purification de la laccase recombinante, le cas échéant marquée, représentée par SEQ ID NO : 2 produite dans le milieu de culture.

20 12. Vecteur d'expression, tel que le plasmide *pELP*, caractérisé en ce qu'il comprend la séquence SEQ ID NO : 3 du promoteur *pLac* de la laccase endogène de *Pycnoporus cinnabarinus*, et correspondant à la séquence SEQ ID NO : 3, ou toute séquence dérivée de ce promoteur par substitution, addition ou suppression d'un ou plusieurs nucléotides et conservant la propriété d'être un promoteur de l'expression de séquences.

25 13. Vecteur d'expression selon la revendication 12, caractérisé en ce qu'il comprend un gène codant pour une protéine recombinante déterminée, et dont l'expression est placée sous le contrôle du promoteur *pLac*.

30 14. Vecteur d'expression selon la revendication 12 ou 13, caractérisé en ce que la protéine recombinante déterminée est une protéine correspondant à une protéine endogène de *Pycnoporus* choisie parmi les suivantes :

- les métalloenzymes, telles que la laccase, ou la tyrosinase,

- les cellulases, les chitinases, les protéinases, les lipases, les amylases,

ou les nucléases.

15. Cellule hôte transformée à l'aide d'un vecteur d'expression selon l'une des revendications 12 à 14.

5 16. Cellule hôte selon la revendication 15, correspondant à des cellules monocaryotiques de souches de *Pycnoporus*, telles que les souches de *Pycnoporus cinnabarinus*.

10 17. Utilisation de vecteurs d'expression selon l'une des revendications 12 à 14, ou de cellules hôtes selon la revendication 15 ou 16, pour la mise en oeuvre d'un procédé de surproduction d'une protéine recombinante déterminée selon l'une des revendications 1 à 9.

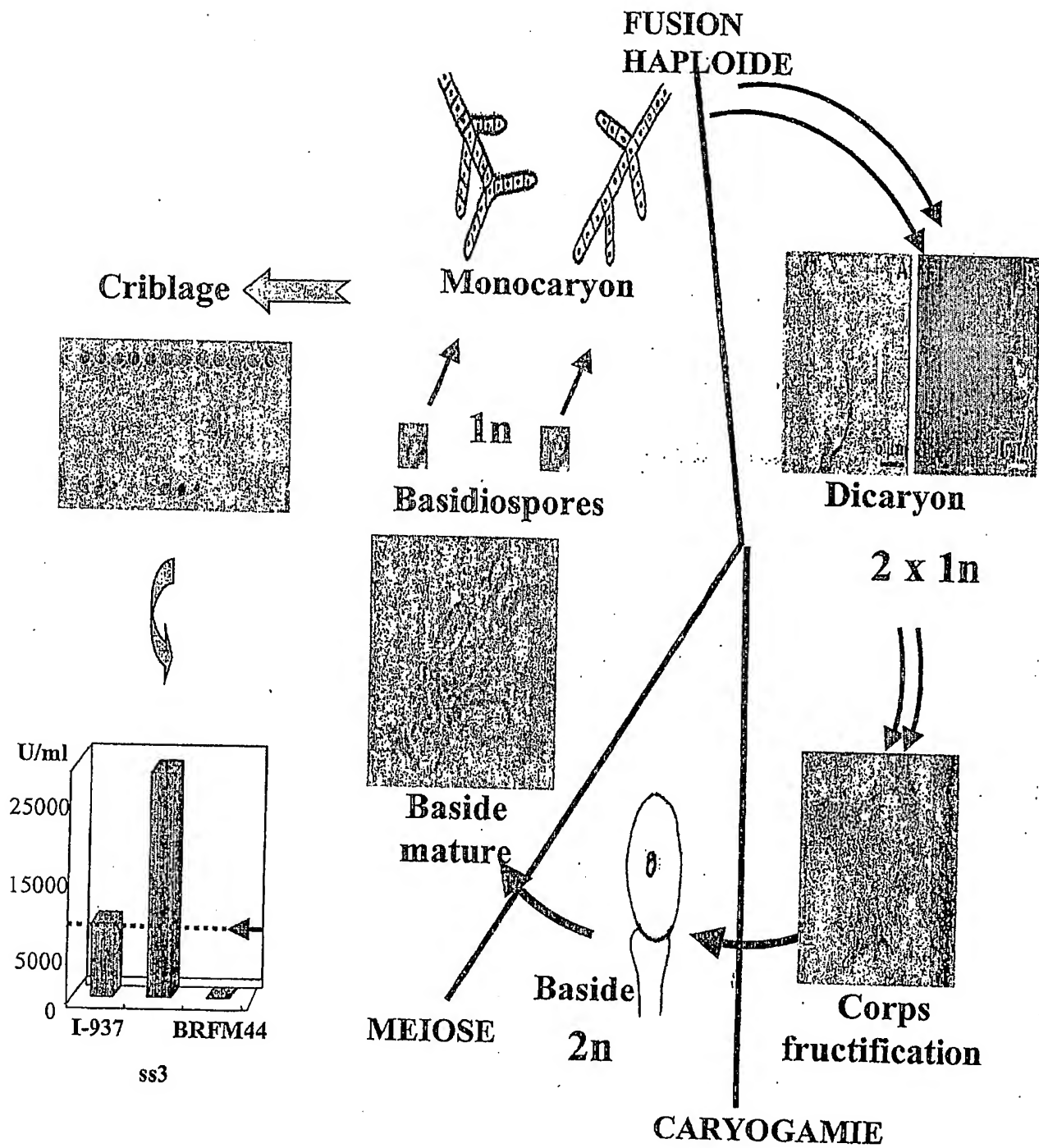


Figure 1 : Isolement de souche monokaryotique déficiente pour l'activité laccase

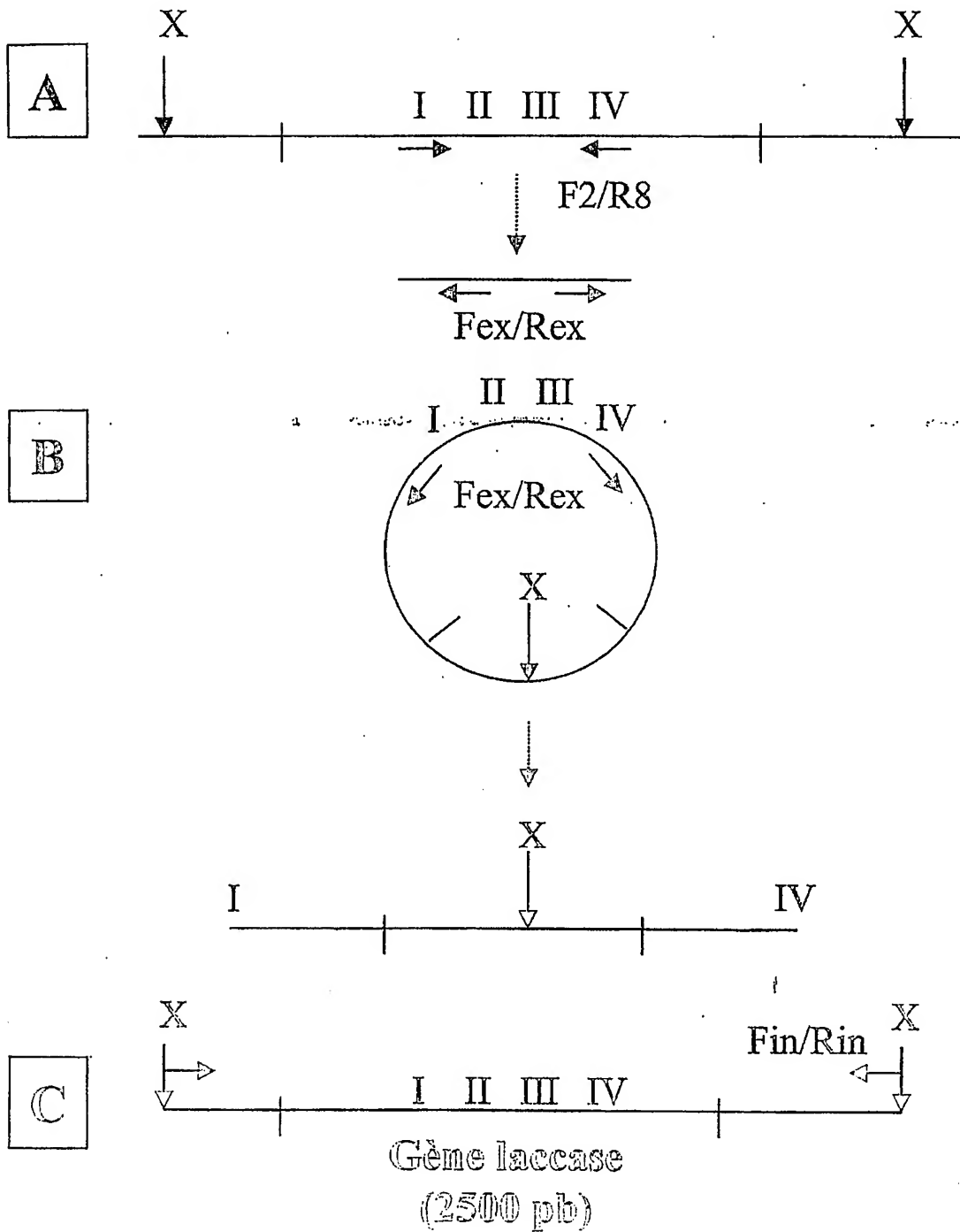


Figure 1 : Schéma du gène codant pour la laccase de *F. mycelium*.
L'unité de transcription est indiquée par une flèche.

3/12

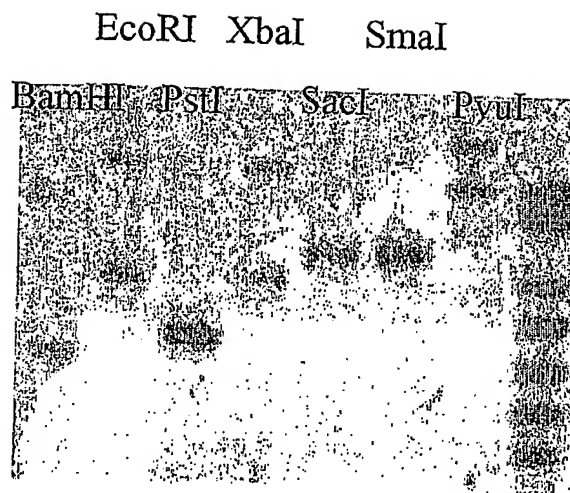


Figure 3 : Etude en Southern blot du gène codant pour la laccase de *Pynoporus cinnabarinus*

CTGCAGACATCTGGAGCGCTGTCTTTCCCTAGTATTAATGATGTCTGTCGCGAGGTCCTTGAAGACCGCTCGAGTCCCACTTGAGTTTATAGTAGGAC 100
 CTGTCCACCAAAACCTCTTTCTGATCATGTGAGGTTCCAGTCCCTCTTCTTCTGCTCTCGTCTCCCTCACCCTGTGGCCACGCGAGCCATAGGGC 200
 N S R F Q S L F F F V L V S L T A V A N A A I G P 25
 CTGTGGCGGACCTGACCCTTACCAATGCCAGGTCAAGCCGATGGCTTCGCTCGCGAGGCGCTGTTGTAACGGTATCACCCCTGCCCTCTCATCAC 300
 V A D L T L T N A Q V S P D G F A R E A V V V N G I T P A P L I T 58
 AGGCAATAGgtatgtatatgtctgtccctcagagctacacatctgatcccaatcgtttagGGCGATCGATTCCAGTCAATGTATCGACCAG 400
 G H K G D R F Q L N V I D Q 72
 F2
 TTGACAAATCATACCATGTTGAAACATCTAGTATTgtaagggttcagttttcccgactaccatgttattgaccatcaccactcgttag CATTGGGACGG 500
 L T N H T M L K T S S I H W H G 88
 (I)
 CTTCTTCAGCAAGGACGAACTGGGCGGATGGTCCGCGTTCGTGAACAGGATGTCCATCGTTTCGGGCACTCGTT CTTGTATGACTTCAAGTTCCC 600
 F F Q Q G T N W A D G P A F V N Q C P I A S G H S F L Y D F Q V P 121
 (II)
 GACCAAGCAGgtacgaattccgtacacgttttcattgctgcgaactaaacctctcttactagGGACTTTCTGGTACCATAGCCATCTCTCCACGCAATA 700
 D Q A G T F W Y H S H L S T Q Y 137
 (II)
 CTGCGATGGTTTGGGCGGCTTTCGTCTACGACCCCAACGATCCTCAGCTAGCCTGTATGACATTGATAACGgtgagcagatcatggtatcgcaa 800
 C D G L R G P F V V Y D P N D P H A S L Y D I D N D 163
 tattgctccacttatgcttcctggcatccagACGACACTGTCAATTACGCTGGCTGATTGGTATCACGTTGCTGCCAAGCTCGGACCTCGCTTCCCgtac 900
 D T V I T L A D W Y H V A A K L G P R F P 184
 gtgtcaaatgtctacagagatctcactatatacagactagactcacttcgctgtacagATTGGCTCCGATTCAACCTTATCAATGACATTGGTCGAA 1000
 F G S D S T L I N G L G R T 198
 CCAGTGGCATAGCACCGTCCGACTTGGCAGTTATCAAGGTCAAGCGAGGCGAAGCGgttaagtgtggtggtcatcactgcacattgggtctgatacatggc 1100
 T G I A P S D L A V I K V T Q G K R 216
 ctgtttccacagCTACCGCTTCCGCTTGGTGTCTGCTTCTTGGCATCCGAACATACATTACGATTGATAATCACACAATGACTATAATTAGGCGGGA 1200
 Y R F R L V S L S C D P N H T F S I D N H T M T I I E A D 245
 CTGATCAACACTCAACCCCTAGAGGTGATTCAATCCAGATTTTGGCGCGCAGCGCTACTCTTCTGGTgtaggtcgtaggtcctgtcatcaagtttg 1300
 S I N T P L E V D S I Q I F A A Q R Y S F V 268
 cagacattcttagatcaccccttttcaatgacagCTGGATGTAGCAGCGGCTGGATTAATCTGGATCCGCGCAACCTCGCTTCCGAAACACAGGTT 1400
 L D A S Q P V D N Y W I R A N P A P G N T G F 291
 TTGCTGGTGAATCAATTCTGCCATCTGCGTTATGATGGCGCACCCGAGATCGAGCTACGTTCTCCAGACTACTCCTACGAAGCCTCTCAACGAGGT 1500
 A G G I N S A I L R Y D G A P E I E P T S V Q T T P T K P L N E V 324
 CGACTTGCATCCTCTCTCGCTATGCTGTGgtacgtgtctcaagaacctcgatcactaagtgcagtgcactcatatggtgcagcagCCTGGCAGC 1600
 D L H P L S P M P V P G S 337
 CCGAGCCCGGAGGTGTGACAAAGCTCTGAACCTTGGTCTTCAACTCTgtgagtactggcgcgctccgtagcacacgttcgaacaagcctgtatccat 1700
 P E P G G V D K P L N L V F N F 353
 gcagAACGGCACCACTTCTTCATCAACGACCAACCTTTGTCGCGCGCTGTGCCAGTCTTGTCTACAAATCCTCAGTGGGCGCGAGGCGCTCAGGAC 1800
 N G T N F I N D H T F V P P S V L L Q I L S G A Q A A Q 385
 CTGGTCCCGGAGGCGAGCGGTGTCTCTCCAGCACTCGTCCATTGAGATATCCTT CCGTCCACTGCCAATGCGCCCTGGATTCCCCCATCCGTTCC 1900
 L V P E G S V F V L P S N S S I E I S F P A T A N A P G P P H P F H 419
 (III)
 ACTTGCACGGTgtacgtgtgcttccctcgtctaaagcgaggatgcgatatctgactcccatcacagCACGCTTCTGCTGTCTCCGAGCGCC GGGAGC 2000
 L H G H A F A V V R S A G 433
 (III)
 AGCGTCTCAACTACGACAACCGATCTTCCGCGAGCTCGTCAGCACCGCGAGCCGCGGACAC AGTCAAGATTCTGCTTGGAGACCAATAACCCAGGCC 2100
 S V Y N Y D N P I F R D V V S T G Q P G D N V T I R F E T N N P G P 467
 R8
 CGTGGTCTCCCTCACTGCCAATGACTTCCACCTCGACGAGGCTTTGCTGTAGTCATGGCGGAGGACACTCCGGACCAAGGCCCGGAAC CCTGTTCC 2200
 W E L H C H I D A G F A V V M A E D T P D T K A A N P V P 500
 (IV) (IV) (IV) (IV)
 TCAGGCGTGGTCCGACTTGTGCCCATCTATGATGCACTTGACCCAGCGACCTCTGAGCGGGATTGTTACTGTGACCTGGT GTGGGGGAACATGTGCA 2300
 Q A W S D L C P I Y D A L D P S D L 518
 GGGCTTTCATCGATCAGGAGCTTCAAGGTTGGCATAATATACCTCAGCGCTGGATGACTCGGACAGCGTGTGGCGTGGGTGTAACCTCTGCTTGTATGT 2400
 TGAAAAAAGGATTTTATGTAGAACATTTATGAGCAATCAGCAATCAATAGGATTGTGTCGTTTCGACGAAATGTCTTGTCTCCCTGACATTACTTTTG 2500
 TCGGAGAAATGGGTCCATGATACATCATTGAGCTCTCAATACCAAGAAGGATTACCCATGTCAATACCAAGATCATGTCTTCTGCTGTCCGCAATGG 2600
 TCTCATGTTGCGTTGAGCAGATCGCAGTACGTTGAAAGCGGATTAGTAT TACATGCAACATGCAACATTGGAAGGGGGATGCAGAGGTTACGTCGCG 2700
 TCAGTCCGCCAAGTAGCGACCTTTGCCGCACTGCCTGTAACTGAACGTATGCTTCAGAATCCGTCGGTATCGAGAGCGATCGTGTACGTTCCGGGAT 2800
 AGATCCATTGATCCCGCTCTGGTCCGCGCGTGCATGBCCCCGAGCGTCACCGGAGCTTCCGATCAGCGTTTCTTAGGGGCGAGGCGGTGTACCCG 2900
 CGTGTACGAGACGAGCTGCTTGTTCGGGTGGGCGAAGGCCCGAAGGAGGCACTCACGAAGACAAATGCGACGTAAATCCGAGGTAGCCTTGCCCGTGT 3000
 GTCACACGCACGGAGAACGTGTGAGCGGCGCAGGTGAGGAGGCGGCGCTTCTGACCGCGCTGTACGAGGTGCGAAATCGAATACGTGATGGCG 3100
 GTCTCCAAAGTCCGTGACGTTGTTGCTGCTGCGCGCGCGCTGGAGCTGCCCAAGGAAATCGAAGGTGGTGAAGTGCAGTCCAAAGCCAAATTCGTA 3200
 GACCGCGCTGCCGCTGTACCACTTGTATGACGCGCGCGCTTGGAGGCTGAGGGGTCAATGCTCACTCTCGGACCTGTATCGCGTATGATGCT 3300
 NASTTGGCTGTGCTGAGCGCTCTGAG 3331

AGATCTCCGAACCAGAAATGCGATTGCGTTGAGGCCCAATTAAGAATAAAGCTGCGTCAGGGCAGCGACGTA
 TCTTGATCCATCATTGACTCACCAGCATCGGCGTCAACACCAAAGCAAGCTCGTCCCACCCATAGGCGTGCA
 CCGGCCGCGTGCGCCATTGAGGTACATGAGCGGGCGAAAGTCCGCCATTGGTAGCCCTGTCGTGGACGCG
 CGGCGATGAAACGTTTCCCACCATTTGGGAAGAAACGCTGCGGCCCATCATCCCTTACCAGGATGACAAGGC
 GCGTCCGCGCCTTTGCCGAGAGGCCGCGGGCGACATGCACAGCGAAGGTCCGTTGCGGATGGGAAGCAGG
 CAATCAGTGGGTGTCTTACGCCGCCACGATGGTCCGGGAGCGTAGGCGCCCTCCCATAAGGCGGCAAGCATC
 ATGATGCTCTCCGATTCCGGGAAGCCTGGTGCATGCTGGAGAGACTCTCTCCGAGAGACCAGTGTGCGCAAC
 GTTCTGGCCTGGAAGACTTTAAAGTGAGTGTAGAAGGGCGAGCAGAGGACGATCATCGGATTGCGGAACC
 ATCGGCATCCTCAGCCTGGGAAGGATGGCTCTTGGTAGACATTTCGCGGAAGGTGTCTTAGATGTGAGCGGGC
 TTCTTGGATGATCATGTGCTAACTTTTTCTGACCTCGTGGTGGTACGCATGGCAGGATTGAGCATTACGGT
 ATGCTCCCATTCATAAACGATAACCCCTTCTTTCAGGTTGGTTCATCTCCATAGAGCGGCACGCTCTCAAGG
 CCTAGGCTATTACACCTCCTTCGCAACATCCCTATTACGGTGTCTGTAAGGAACGACTTGTCTATGGGATC
 ACATGAAGTGCAGCATACTGTTCCCGGTCTCGCAGTACAGACGCTAGTACGGGAAGTCGACATCCAAAGCCT
 TCAGTCACCACATGGCAAAAAAGCTGCACCATACTCTTTATGGTGAGTTGTTTCGTGAGTGGTATACAGTCAT
 TCATGAGGGAATGCCACCGGATAGGGTGTGGCGCCGCAATATTCATCGCCTGGCAATAGTCGATGTGCGT
 CCTTGTTCATGAATATCATGGGTACATGTGGAGACGGTTAAACAGCGTTGACTGTGAATCCCTGGTGTGT
 GTTGGGCGAACAGGTACGTTGCAGGAACACCAATATCTCTTCGCGAGCCAGTTCTTTGCGAGCGGCACAG
 GCAGGCATCGCGCAACAGATCCAGCCATCCGGCCTCTGACATTCGGGATACCTGAAGCCCTTCAGGTACGG
 AGCGAAGAGGTGGGCTCTCTGCAGCGATTGGCGGACGGATAGCTGATTTCTCTCACCATTGGGAAGAT
 GTGAAAGGCTCCATCATATAGCGGCTCAACTCTACCTCGAATGTCCAAACACGGCGGGAATACTTATTTATG
 TGGACAAGGCCGAGCTATGATAGCTTGCTCCCGAAGTTGGTAAGTCCCGCAATCTGCGGTTTCAGGCAACAGT
 CTCGGAATAAAGAAGAATATTGTAGGTGCGTGTAGGCGTATCGCCCAAATGCGCACACACGGAGGCTTTA
 GGAGATGAAGCGCCGTGAGCGGTAAGGGAGTTGGTTACCGCGCCCGGCGGACTCTCTCTTTCCAG
 CATCATGTCTCGGCGCAAACTTTACCCTCTATTGACCACTCCACGAGAAAGCAGGAACAGCTTCTTGTCT
 CTCATGACGTCCGCAATCCAGACCCTTAGCCGGTTCTGTACTCATCGTTATCCCTGCCGCCATGCTTGTGGA
 GTCAGCCTGGCCAGTGCCTAGTCCCGTCTCTTGTCTGCACTAGAGAAGCCCCATGAGACAGCGTTTGTGTC
 TTTATTTCTGCTGTTTCTATAGACACCATAGGGGGCAAACGATCCTGCACGCCAGAGGTATTGGGCTCGTCA
 GATTCACGATTTTCTCCTCGGTCTGAATCGGCTGCACGGCAGATAAATCGGCCGGAATGCTATAGCCCTT
 CATAGCCCGCTATGAGAGTCGCAAAAGGCTTGTGAGTCAGGTCGGTTCGAGTGGCTCTCACGAAGAGCGTCAA
 CTTGCGCGGACAGCCGCTTTTCAGGGCAAGATAGATCCTCCCATCATCCCTACTGCGCTCAGCGCCGGTAC
 CGAACAATTGACTTACCGACATCCTCCGGGACGCGCAATGCTGTTGACGGAACGTAATCCTCTTCGTCCC
 GCCTCTTTTCGCTCTCACGCATTCCGTGTGGTTTCGCGGACGGCCGCTCATCAGGACCAGACCAGTCTCAAT
 GTCTGGTACCGGCACAATGGTGACACTGCGGCAACTGAGTAGGTCTGGTCACTCTGGTGCACCGCTCGCTTAC
 GCTGACCTTCGGGATACTGTCTGCAGACATCTGGAGCGCCTGTCTTTCCCTAGTATAAATGATGTCTGTC
 CGCAGGTCCTTGAAGACCGCTCGAGTCCCACTTGAAGTTTAGGTAGGACCTGTCCACCAACCCCTCTTTCT
 GATCATG

**Figure 5 : Séquence de la séquence promotrice du gène
 codant pour la laccase de *Pycnoporus cinnabarinus* (jusqu'à
 l'ATG codant pour la méthionine de la laccase)**

6/12

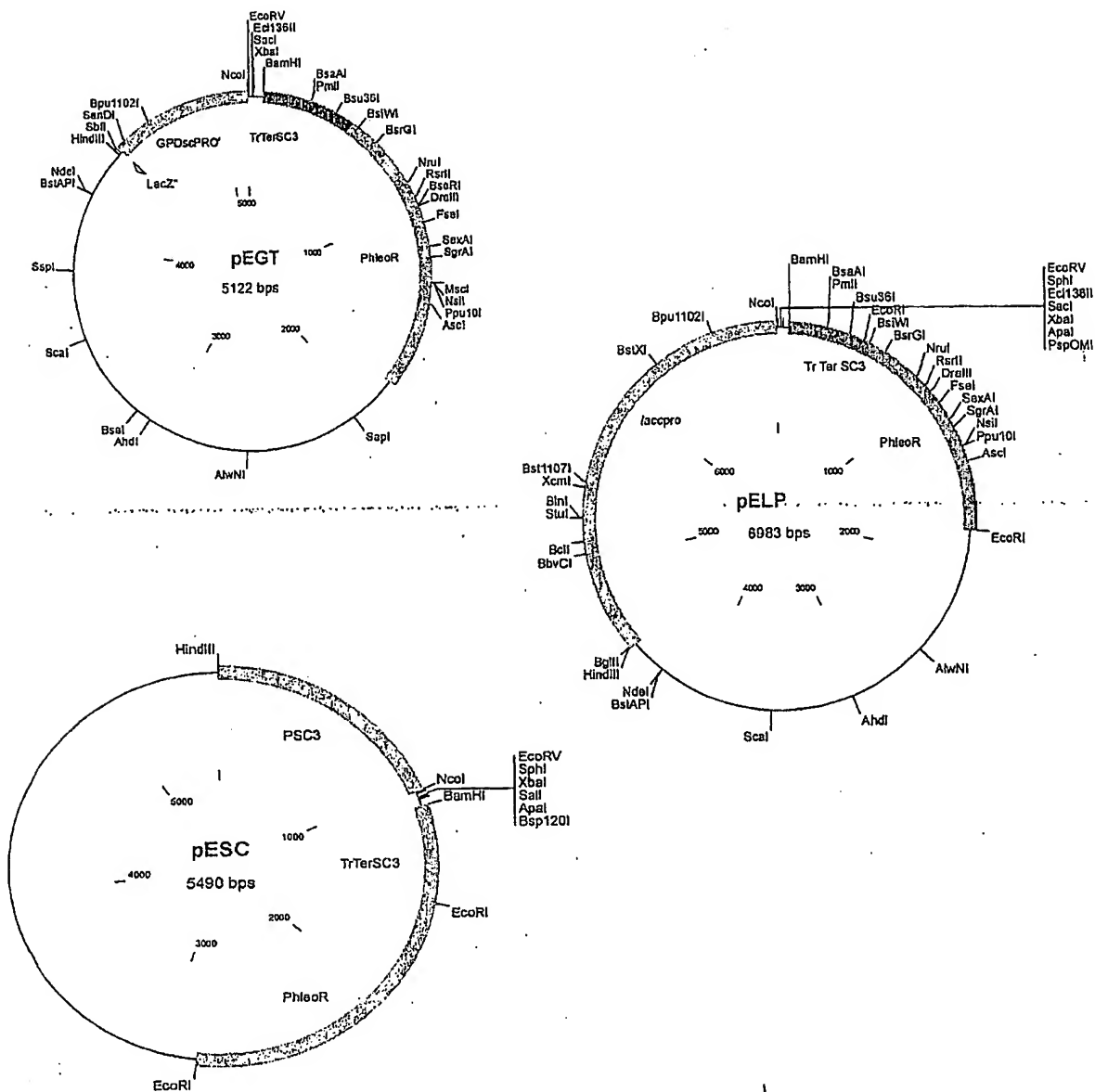


Figure 6 : Carte physique des trois vecteurs d'expression utilisés pour la production de la laccase chez *Pycnoporus cinnabarinus*

CATGGGATATCGCATGCCTGCAGAGCTCTAGAGTCGACGGGCCCGGTACCGCGGCCGCTTAAGACGCGTGGATCCGCAGGTGAAC
 GCGCCTATCGGTGGGATATTTCGGGCGACGGGAGCCTCGGCAATCTGAGCCTCGTTACTGCCTAGCAAAATTCGGAATCCCTTCGATGT
 CATAGGGTCGCGGACAAGTGATCGTCTTGCTACATACTCCAAGGTGTGACTCATTCCTCGATAATGAACATTTGTTGTTGTTTQ
 TTCTCTATCCGCTCAGTCACGCGACCCACACGTGCATGGTTGAATTCGCCACGCAACAACCGCATGACGACATGGCGAACCTAAG
 TAAAGGCTGAGTCGTGGACTAAAGCACTCCACTTTACGGCGAGGATGCCAGTCTACGTCATGAATGAAGCCTCAGGTCCCGAAGTAA
 GGGGTACAAAAGGAGGGTGAAAGGTGGACGTTTCTTACCATTCTTCCACCTCCAGACCACCATGCCGGGAATTCAGGCTTGCT
 CAAAAAGGTTCTGCCCGTACGCCCGGAAATTCCTTCAGGTGGCCCTATCGCATACATGCACGACTCAAAACATCCATTCTATC
 ATTTTGGGATCGTACAATTATTAGACATGTTGTACAACGTTACATTCCTTTCTTTTACTCTCCGGCCAGTCTATGTAGAGGTAAA
 GTACAAGCGTCAAAGGATCAGGCATCTAGAGCGCGCCGCTTGCTTCGCCGCTTAGAGCGCGCGTCTGCTTCGCCGCTAGACG
 AGCAGGTCGACACACGCGCGGAGTAGCCCACTGTTGCTACAGGCAATGAGCTTCACGAAGCTCTTGCTGATCGCGATGCCG
 GGGATCGATCCACGCGCTTAAGGGCGCGCGGTACCCCTCGGACCGTCCGAGAACTCGGCGCGCGTCCGACCGCGCGTCTGCTGCGCTG
 TCAGTCTGCTCCTCGGCCACGAAGTGACGCGAGTTGCCGCGCGGTTCGCGCAGGGCGAACTCCCGCCCCACGGCTGCTCGCCGAT
 CTCGGTCATGGCCGCGCGGAGGCGTCCCGGAAGTTGCTGGACACGACCTCCGACCACTCGGCGTACAGCTCGTCCAGGCGCGCAC
 CCACACCCAGGCGCGGTGTTGTCCGCAACACCTGCTGACCGCGCTGATGAACAGGGTCACGTCGTCGCCGACCAACCGGCG
 GAAGTCGCTCCACGAAGTCCCGGGAACACCGAGCGGTCGCTCCGAGAACTCGACCGCTCCGCGACGTCGCTGCTGCGCTGAGCA
 CCGGAACCGCACTGTTCAACTTGCCATGTCATGGTGATGGGCATTATGTGTGATGGGATGCGATGGGAGAGGGAAAGTCTGCTGATG
 GGAGTGTGGAGAAAGAGGGAGACGGCGGGCGCGCGCTTTATACCCACGCCGAAAGATCCGATCGATACGACAAAACGGGA
 TGAACACATCGGCGCGCGCTGGATGCGCGCATGCGCAATGCCAGCCAGTCCCGTCCGGCGCCACCACAGCCCTGGTTCGAGT
 CCCCCTCGAGGGCGACGCTCTATTCTATCCATGCGCGCAATTCGAGGTGCGCGTCCGAGAACTCGGCGCGCGCTGCTGCGCACC
 TGGGCTGCGACCGCTGTCTACCTCTCATCTAACCCCTCCGCGGCTTCGCGAGTACAGTACTAATCTCACACCGAAGAGGCTCTCGCGC
 CACCCTCGATCCCGAGCAGTTCCTTACATGCCACAGCGTCAGAATTGAACACAATGCACGTCARATCAGTCCCGGGAATTCGT
 AATCATGGTCTAGCTGTTTCTGTGTGAATTTGTTACCTGTCACAAATTCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAAG
 CCTGGGTGCGCTAATGAGTGAGCTAACTACATTAATTGCGTTCGCGTCACTGCCCGCTTTCAGTCCGGAAACCTGCTGCTGCGAGT
 GCATTAATGAATCGGCCAACCGCGCGGAGAGGGCGTTTCGCTATTGGGCGCTCTTCGCTCTCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCG
 GTCGTTGCGCTGCGCGAGCGGTATCAGTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACCGAGGAAAGAA
 CATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAGGCGCGGTTGCTGCGCTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACG
 AGCATCAAAAAATCGACGCTCAAGTCAAGGTGCGGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCC
 CTCGTGCGCTCTCTGTTCCGACCCCTGCGGCTTACCGGATACCTGTCCGCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTCTCATAGCTC
 ACGCTGTAGGTA TCTCAGTTCGCTGATAGTCTGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCGCTTCAGCCGACCGCTGCGCGC
 TTATCCGGTAACATCTGCTTTGAGTCCAAACCGGTAAGACACGACTTACGCCACTGGCAGCAGCCACTGTTAACAGGATTAGCAGA
 GCGAGGTATGTAGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGTGCGCTAATACGGCTACACTAGAAGGACAGTATTGTTGATCTGCGCT
 CTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAAACAAACCCGCTGTTAGCGGTGGTITTTTGT
 GCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAGATCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAAACGAA
 AACTCAGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAAGGATCTTCACTAGATCTTTTAAATTAATAAATGAAGTCTTAAATCAA
 TCTAAAGTATATATGAGTAAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTCGTT
 ATCCATAGTTGCTGACTCCCGCTGCTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTCTGCAATGATACCGCG
 AGACCCAGCTACCGGCTCCAGATTATACGCAATAAACCAGCCAGCCGGAAGGGCGAGCGCAGAAGTGGTCTGCACTTTATC
 CGCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCCGGGAAGCTAGAGTAAGTGTGCGCAAGTTAAGTTTGGCGCAACGTTGTTGCCATTGCT
 ACAGGCATCGTGGTGTACGCTCGTCTTGGTATGGCTTCACTCAGCTCCGTTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCCA
 TGTGTGCAAAAAAGCGTTAGCTCTCTCCGCTCCGATCGTTGTGAGAGTAAGTTGGCCGAGTGTATCACTCATGTTATGGC
 AGCACTGCATAATTCTCTTACTGTCTATGCCATCCGATCGTATGCTTTTCTGTGACTGGTGAAGTACTCAACCAAGTCACTCTGAGAATAG
 TGTATCGCGGACCGAGTTGCTCTTGGCCGCGTCAATACGGGATAATACCGCGCCACATAGCAGAACTTTAAAGTGTCTCATATT
 GGAACCGTTCTTCCGGGCGAAAACTCTCAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGTGACCCCACTGA
 TCTTCAGCATCTTTTACTTTACACAGCGTTTCTGGTGAGCAAAAAAGGAAAGGCAAAATGCCGCAAAAAAGGGAATAAGGGCGAC
 ACGGAAATGTTGAATACTCATACTCTTCTTTTCAATATTATGAAGCATTTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTG
 AATGTATTAGAAAAATAAACAAATAGGGGTTCGCGCACATTTCCCCGAAAAAGTGCCACCTGACGCTCTAAGAAACCATATTATCA
 TGACATTAACTATAAAAAATAGGCGTATCAGAGGCCCTTTCGCTCTCGCGGTTTCGGTGTGACGCTGAAACCTCTGACACATGC
 AGTCCCGGAGACGGTACAGCTTGTCTGTAAGCGGATGCCGGGAGCAGACAAGCCCGTCAAGGCGCTCAGCGGGTGTGGCGGG
 TGTGCGGGCTGGCTTAATATGCGGCATCAGAGCAGATTGTACTGAGAGTGCACCATATGCGGTGTGAAATACCGCACAGATGCGTA
 AGGAGAAAAATACCGCATCAGGCGCCATTCCGCAATCAGGCTGCGCAACTGTTGGGAAGGGCGATCGGTGCGGGCTCTTCGCTATTA
 CGCCAGCTGGCGAAAGGGGATGTGCTGCAAGGCGATTAAAGTTGGGTAACGCCAGGGTTTCCAGTTCACGAGCTGTGTAACACGAC
 GGCCAGTGCCAAAGCTTGCATGCGCTGACGAGTGCAGCGCGCGCCACCCAGCTATCCCGCGCGGGTCCGGACCCAAAAATAA
 GCGGGCCCCGCGCGCCCGTCCGGCGAGCGGGTGTATCTACGAACGGAAGTGGGAGGCGACTCGGAAGAATTTGTTTAGAAAGGG
 GAACACCATCGCGGACGGCCAGTGTCTGDDCAGCTGAGCGTGCAATTGTGTTCAATTCTGACCTGTGGCATGTAAGGAACGTGCTC
 GGGATCGGAGGGTGGCGGAGAGCCTCTCGGTGTGAGATTAGTAAGTGTACTGCGAAGCCGCGGAGGGGTTAGGATGAGAGGTAG
 ACAGGTCGCGAGCCAGGTGCGAGAAAGGACTGCGAAGGACTGTTCTCGACCGCGCACCTGCAATTGCGCGCATGGATAGAATAGA
 GCGTCCCGCTCGAGGGGAGTCCAGAGGCTGGTGGTGGCGCCGACGGGACTGGCTGGGCATTGTCAGATGGCGCGCATGTCAG
 GCGCGCGCGATGTGTTATCCCGTTTGTGAGTATCGATCGGATCTTTCGGCGGTGGGTATAAAGCGCGCGCGCGCGCTCTCCCT
 CTTTCTCCAGCACTCCATCCAGAGCACTCCCTCTCCATCGCATCCCATCACACAATAATGCCCATCAC

Figure 7 : Séquence nucléotidique du vecteur pEGT, contenant le promoteur du gène *gpd* (4480-5122), un marqueur de résistance à la phléomycine (507-1822) et le terminateur du gène *sc3* (71-507).

Figure 9 : Séquence nucléotidique du vecteur pELP, contenant le promoteur du gène laccase (4457-6983), un marqueur de résistance à la phléomycine (507-1822) et le terminateur du gène sc3 (71-507) (suite de la séquence, page suivante)

10/12

CAGCGAAGGTCGGTTCGGGATGGGAAGCAGGCAATCAGTGGGTGTCTACGCCGCCACGATGGTTCGGGGAGCGTAGGCGCCCTCCCA
 TAAGGCGGCAAGCATCATGATGCTCTCCGATTTCGGGAAGCCTGGTGGGATGCTGGAGAGACTCTCTCCGAGAGACCAGTGTGGCAAC
 GTTCCTGGCCTGGAAGACTTTAAAGTGAGTGTAGAAGGGCGAGCAGAGGACGATCATCGGATTGCAGGAACCATCGGCATCCTCAGC
 CTGGGAAGGATGGCTCTTGGTAGACATTCCGGGAAGGTGTCTAGATGTGAGCGGGCTTCTTGGATGATCATGTCTGTAACCTTTTCTGA
 CCTCGTGGTGGTACGCATGGCAGGATTAGCATTACGGTATGCCCTCCATTCAAAACGATAACCCCTTCCTTCAGGTTGGTTCATCTC
 CATAGAGCGGCACGCTCTCAAGGCCTAGGCTATTACACCTCTCTCGCAACATCCCTATTACCGGTGTCTGTAAGGAACGACTTGTCTAT
 GGGATCACATGAAGTGCAGCATACTGTTCCGCCGTCTCGCAGTACAGACGCTAGTACGGGAAGTCGACATCCAAAGCGTTCAGTACCA
 CATGGCAAAAAAGCTGCACCATACTCTTTATGGTGAAGTTGTTTCGTGAGTGGTATACAGTCATTTCATGAGGGAATGCCACCGGATAGG
 GTGTGGCGGCCGCAATATTCATCGCCTGGCAATAGTCGATGTGCGTCTTGTTCATGAATATCATGGGTACATGTGGAGACGGTTAA
 ACAGCGTTGACTGTGAATCCCTGGTGTGTGTTGGGCCGAACAGGTACGTTGCAGGAACACCAATATCTCTTCGGCAGCCAGTTCTTTG
 CGAGCGGCACAGGCAGGCATCGCGCAACAGATCCAGCCATCCGGCTCTGACATTCCGGGATACCTGAAGCCCTTCAGGTACGGAGC
 GAAGAGGTGGGCTCTCTGCAGCGATTGGCGGACGGATAGCTGTATTTCTCTCTCACCATTGGGAAGATGTGAAAGGCTCCATCATAT
 AGCGGCTCAACTCTACCTCGAATGTCCAAACAGGCGGGAATACTTATTTATGTGACAAGGCCGAGCTATGATAGCTTGCTCCCGAA
 GTTGGTAAGTCCGCAATCTGCGGTTACGGCAACAGTCTCGGAAAAAATAAGAAGAATATTGTAGGTGCGTGTAGGCGTATCGCCCAAA
 TGCGCACACAGGAGGCTTTAGGAGATGAAGCGCCCGTGAGCGGTAAGGGAGTTGGTTCACCGCCGCCCGACCGACTCTCTCTCTT
 CCCAGCATCATGTCTCGGCGCAAACTTTACCTCTATTGACCAACTCCACGAGAAAGCAGGAACAGCTTCTCTCTCTCATGACGTCC
 GCAATCCAGACCCCTAGCCGTTCTGTTACTCATCGTTATCCCTGCCGCCATCGTAGTGGAGTCAGCCTGGCCAGTGGTGTAGTCCCGTCT
 CTCTTGCTGCACTAGAGAAGCCCATGAGACAGCGTTTCTGCTTTATTTCTGCTGTTTCTATAGACACCATAAGGGGCAAAACGATCCTG
 CACGCCCAGAGGTATTGGGCTCGTCAGATTCCAGTCTTCTCTCGGTCTGAATCGGCTGCACGGCAGATAAAATCGGCCGGAATGCT
 ATAGCCCTTCATAGCCCGCTATGAGAGTCGCAAAAGGCTTGTGAGTCAGGTGCGTGGTGGCTCTACGAAGAGCGTCAACTTCGG
 CGACAGCCGCTTTTCAAGGCAAGATAGATCCTCCATCATCCCTACTGCGCTCAGCGCCGGTAACCGAACAATTGACTTACCGACATC
 CTCGGGACGCGCAAAATGCTGTTTCGACGGAACGTAATCCTCTTCGTCCCGCTCTTTTCGCTCTCACGCATTCCGTGTGGTTCGCGCA
 CGGCCGCTCATCAGGACAGACAGTCTCAATGTCTGGTACCGGCACAATGGTGACACTGCGGCAACTGAGTAGGTCTGGTCACTCTG
 GTGCACCGTCGCTTACGCTGACCTTCGGGATACTGTCTGCAGACATCTGGAGCGCCTGTCTTCCCTAGTATAAATGATGTCTGTCC
 GCAGGTCCTTGAAGACCGCTCGAGTCCACTTGAGTTTAGGTAGGACCTGTTCTCCACAACCCCTCTTTC

**Figure 9 : Séquence nucléotidique du vecteur pELP (suite),
 contenant le promoteur du gène laccase (4457-6983), un
 marqueur de résistance à la phléomycine (507-1822) et le
 terminateur du gène sc3 (71-507)**

11/12

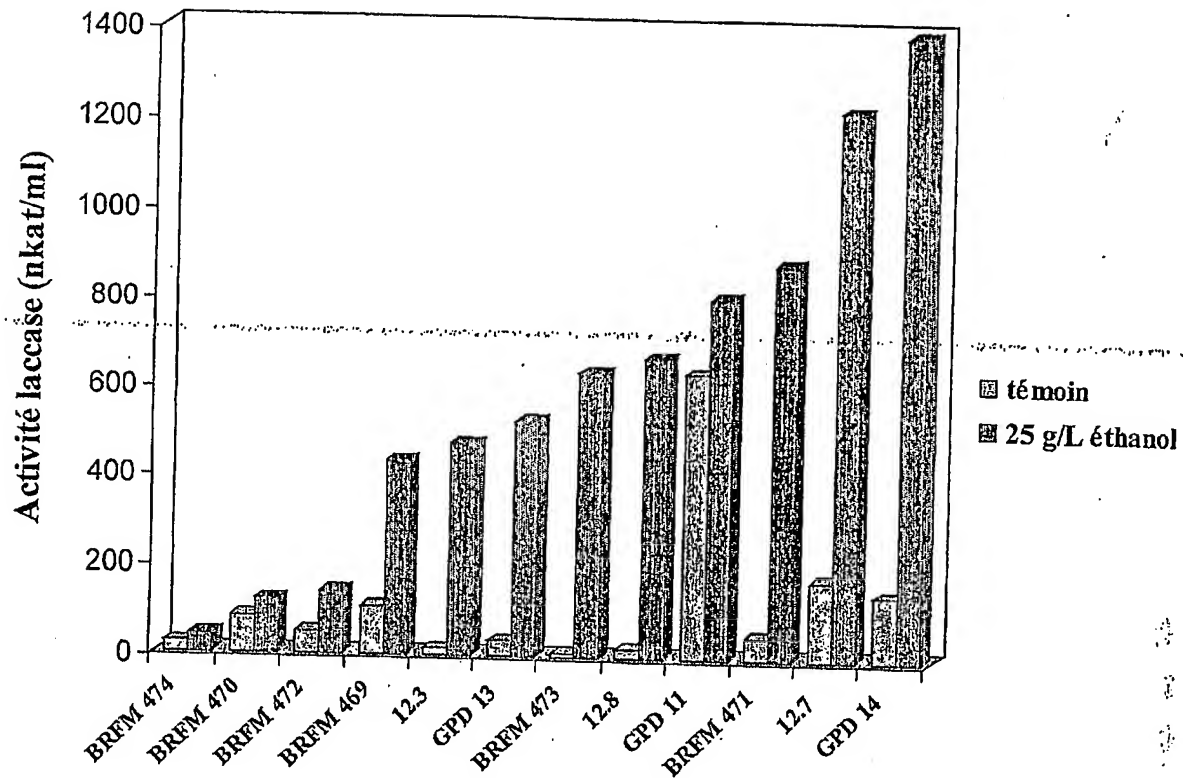


Figure 10 : Résultats de production des transformants présentant les activités les plus importantes. La culture a été effectuée avec ou sans (témoin) éthanol

12/12

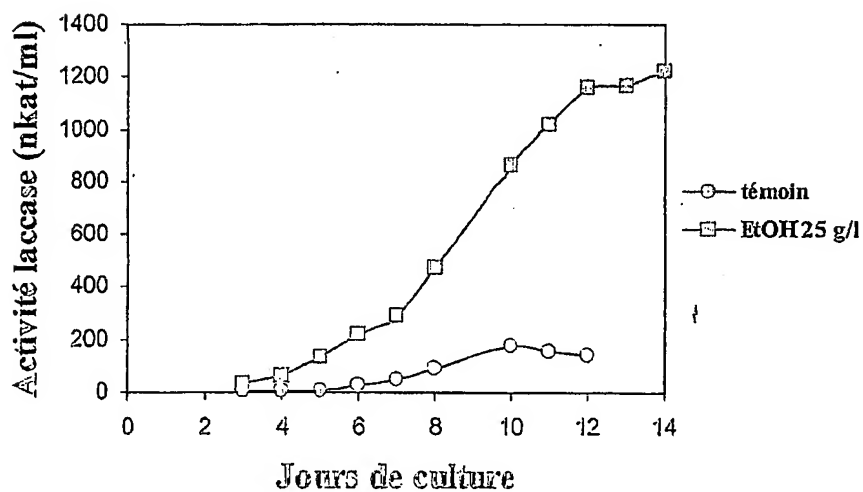
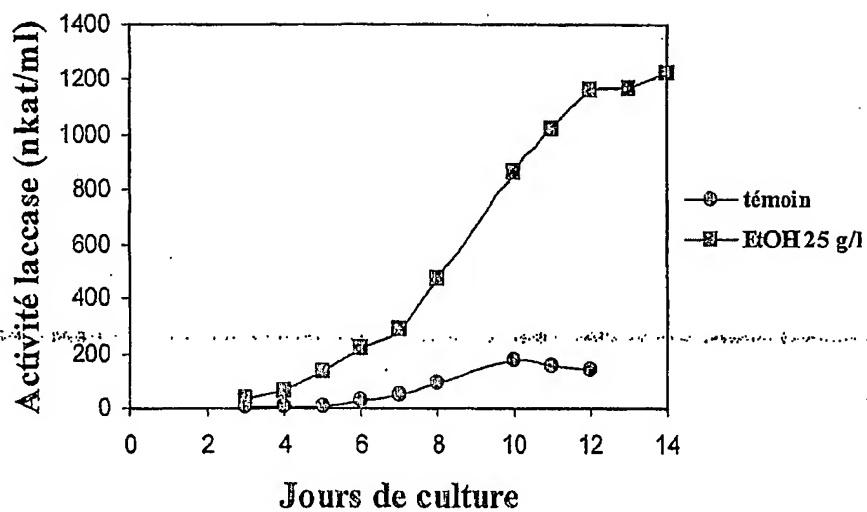


Figure 11 : Suivi des activités laccase des transformants CFE 14 et 117 en fonction du temps avec un réactif para-Subanole

ctccttcgtg gtaggtcgta ggctcctgtc atcaagtttg cagacattct tagatacacc 1320

tttttcaatg cagctggatg ctagccagcc ggtggataac tactggatcc gcgcaaacc 1380

tgccttcgga aacacaggtt ttgctgggtg aatcaattct gccatcctgc gttatgatgg 1440

cgcacccgag atcgagccta cgtctgtcca gactactcct acgaagcctc tgaacgaggt 1500

cgaattgcat cctctctcgc ctatgcctgt ggtacgtgtc tcaaagaacc tcgatcacta 1560

agtgcattgc aactcatatg gtgcatgaca gcctggcagc cccgagcccg gaggtgtcga 1620

caagcctctg aacttgggtc tcaacttcgt gactactggc gcgcttccgt agcacacgtt 1680

cgaacaaagc ctgataccat gcagaacggc accaacttct tcatcaacga ccacaccttt 1740

gtcccgccgt ctgtcccagt cttgctacaa atcctcagtg gggcgagggc ggctcaggac 1800

ctgggtcccg agggcagcgt gttcgttctt cccagcaact cgtccattga gatatacttc 1860

cctgccactg ccaatgcccc tggattcccc catccgttcc acttgacagg tgtacgtctg 1920

ccttcccctc gtctaaaggc ggagtcgata tctgactccc atcacagcac gccttcgctg 1980

tcgtccggag cgcggggagc agcgtctaca actacgacaa cccgatcttc cgcgacgtcg 2040

tcagcaccgg ccagcccggc gacaacgtca cgattcgctt cgagaccaat aaccagggc 2100

cgtggttccct ccaactgccac attgacttcc acctcgagc aggctttgct gtagtcatgg 2160

ccgaggacac tccggacacc aaggccgga accctgttcc tcaggcgtgg tcggacttgt 2220

gccccatcta tgatgcactt gacccagcg accctcgagc gggattgtta ctgtgacctg 2280

gtgtgggggg aacatgtcga gggctttcat cgatcagga ctttcaaggc tggcataata 2340

tacctcacgg cctggatgac tcggacagcg tgtgggcgtg ggtgtaactc tgcttgatgt 2400

tgaaaaaagg attttatgta gaacaattta tgagcaatca gcaatcaata ggattgtgtc 2460

ggtttcgagc aaatgtcttg tctccctgac attacttttg gtgcgagaaa tgggtccatg 2520

atacacatca ttgagctctc aataccaaga aggattacc atgtcaatac ccaagatcat 2580

gtcttcgctg tccgcaatgg tctcatgttg cgttgagcag atcgagtagc gttgaaaagc 2640

gattagtatt acatgcaaca tgcaacattt ggaagggggc atgcagaggt tcagctcgcg 2700

tcagtcggcc aagtagcgac ctttgccgca ctgcctgtta acctgaacgt atgcttcaga 2760

actccgctcg tctcgagagc gatcgtgtac gttccgggat agatccattg atccccgctc 2820

tggtcgcgcg gtgcgatggc cccgagcgtc accggcagct tcgcgatcgc gcttttccta 2880

ggggcgaggg cgtgtacccg cgtgtacgag acgagctgct tgttcgggtg gggcgaaggc 2940

ggggaaggac cactcctcga gacccatgag acgtaatcag tcgcagcctt gggcaggtta 3000

ggggaaggac cactcctcga gacccatgag acgtaatcag tcgcagcctt gggcaggtta 3060

ggggaaggac cactcctcga gacccatgag acgtaatcag tcgcagcctt gggcaggtta 3120

ggggaaggac cactcctcga gacccatgag acgtaatcag tcgcagcctt gggcaggtta 3180

ggggaaggac cactcctcga gacccatgag acgtaatcag tcgcagcctt gggcaggtta 3240

ggggaaggac cactcctcga gacccatgag acgtaatcag tcgcagcctt gggcaggtta 3300

ggggaaggac cactcctcga gacccatgag acgtaatcag tcgcagcctt gggcaggtta 3360

ggggaaggac cactcctcga gacccatgag acgtaatcag tcgcagcctt gggcaggtta 3420

ggggaaggac cactcctcga gacccatgag acgtaatcag tcgcagcctt gggcaggtta 3480

ggggaaggac cactcctcga gacccatgag acgtaatcag tcgcagcctt gggcaggtta 3540

ggggaaggac cactcctcga gacccatgag acgtaatcag tcgcagcctt gggcaggtta 3600

ggggaaggac cactcctcga gacccatgag acgtaatcag tcgcagcctt gggcaggtta 3660

ggggaaggac cactcctcga gacccatgag acgtaatcag tcgcagcctt gggcaggtta 3720

ggggaaggac cactcctcga gacccatgag acgtaatcag tcgcagcctt gggcaggtta 3780

ggggaaggac cactcctcga gacccatgag acgtaatcag tcgcagcctt gggcaggtta 3840

ggggaaggac cactcctcga gacccatgag acgtaatcag tcgcagcctt gggcaggtta 3900

ggggaaggac cactcctcga gacccatgag acgtaatcag tcgcagcctt gggcaggtta 3960

ggggaaggac cactcctcga gacccatgag acgtaatcag tcgcagcctt gggcaggtta 4020

ggggaaggac cactcctcga gacccatgag acgtaatcag tcgcagcctt gggcaggtta 4080

ggggaaggac cactcctcga gacccatgag acgtaatcag tcgcagcctt gggcaggtta 4140

ggggaaggac cactcctcga gacccatgag acgtaatcag tcgcagcctt gggcaggtta 4200

ggggaaggac cactcctcga gacccatgag acgtaatcag tcgcagcctt gggcaggtta 4260

ggggaaggac cactcctcga gacccatgag acgtaatcag tcgcagcctt gggcaggtta 4320

ggggaaggac cactcctcga gacccatgag acgtaatcag tcgcagcctt gggcaggtta 4380

ggggaaggac cactcctcga gacccatgag acgtaatcag tcgcagcctt gggcaggtta 4440

ggggaaggac cactcctcga gacccatgag acgtaatcag tcgcagcctt gggcaggtta 4500

ggggaaggac cactcctcga gacccatgag acgtaatcag tcgcagcctt gggcaggtta 4560

ggggaaggac cactcctcga gacccatgag acgtaatcag tcgcagcctt gggcaggtta 4620

ggggaaggac cactcctcga gacccatgag acgtaatcag tcgcagcctt gggcaggtta 4680

ggggaaggac cactcctcga gacccatgag acgtaatcag tcgcagcctt gggcaggtta 4740

ggggaaggac cactcctcga gacccatgag acgtaatcag tcgcagcctt gggcaggtta 4800

ggggaaggac cactcctcga gacccatgag acgtaatcag tcgcagcctt gggcaggtta 4860

ggggaaggac cactcctcga gacccatgag acgtaatcag tcgcagcctt gggcaggtta 4920

ggggaaggac cactcctcga gacccatgag acgtaatcag tcgcagcctt gggcaggtta 4980

ggggaaggac cactcctcga gacccatgag acgtaatcag tcgcagcctt gggcaggtta 5040

ggggaaggac cactcctcga gacccatgag acgtaatcag tcgcagcctt gggcaggtta 5100

ggggaaggac cactcctcga gacccatgag acgtaatcag tcgcagcctt gggcaggtta 5160

ggggaaggac cactcctcga gacccatgag acgtaatcag tcgcagcctt gggcaggtta 5220

ggggaaggac cactcctcga gacccatgag acgtaatcag tcgcagcctt gggcaggtta 5280

ggggaaggac cactcctcga gacccatgag acgtaatcag tcgcagcctt gggcaggtta 5340

ggggaaggac cactcctcga gacccatgag acgtaatcag tcgcagcctt gggcaggtta 5400

ggggaaggac cactcctcga gacccatgag acgtaatcag tcgcagcctt gggcaggtta 5460

ggggaaggac cactcctcga gacccatgag acgtaatcag tcgcagcctt gggcaggtta 5520

ggggaaggac cactcctcga gacccatgag acgtaatcag tcgcagcctt gggcaggtta 5580

ggggaaggac cactcctcga gacccatgag acgtaatcag tcgcagcctt gggcaggtta 5640

ggggaaggac cactcctcga gacccatgag acgtaatcag tcgcagcctt gggcaggtta 5700

ggggaaggac cactcctcga gacccatgag acgtaatcag tcgcagcctt gggcaggtta 5760

ggggaaggac cactcctcga gacccatgag acgtaatcag tcgcagcctt gggcaggtta 5820

ggggaaggac cactcctcga gacccatgag acgtaatcag tcgcagcctt gggcaggtta 5880

ggggaaggac cactcctcga gacccatgag acgtaatcag tcgcagcctt gggcaggtta 5940

ggggaaggac cactcctcga gacccatgag acgtaatcag tcgcagcctt gggcaggtta 6000

ggggaaggac cactcctcga gacccatgag acgtaatcag tcgcagcctt gggcaggtta 6060

ggggaaggac cactcctcga gacccatgag acgtaatcag tcgcagcctt gggcaggtta 6120

ggggaaggac cactcctcga gacccatgag acgtaatcag tcgcagcctt gggcaggtta 6180

ggggaaggac cactcctcga gacccatgag acgtaatcag tcgcagcctt gggcaggtta 6240

ggggaaggac cactcctcga gacccatgag acgtaatcag tcgcagcctt gggcaggtta 6300

ggggaaggac cactcctcga gacccatgag acgtaatcag tcgcagcctt gggcaggtta 6360

ggggaaggac cactcctcga gacccatgag acgtaatcag tcgcagcctt gggcaggtta 6420

ggggaaggac cactcctcga gacccatgag acgtaatcag tcgcagcctt gggcaggtta 6480

ggggaaggac cactcctcga gacccatgag acgtaatcag tcgcagcctt gggcaggtta 6540

ggggaaggac cactcctcga gacccatgag acgtaatcag tcgcagcctt gggcaggtta 6600

ggggaaggac cactcctcga gacccatgag acgtaatcag tcgcagcctt gggcaggtta 6660

ggggaaggac cactcctcga gacccatgag acgtaatcag tcgcagcctt gggcaggtta 6720

ggggaaggac cactcctcga gacccatgag acgtaatcag tcgcagcctt gggcaggtta 6780

ggggaaggac cactcctcga gacccatgag acgtaatcag tcgcagcctt gggcaggtta 6840

ggggaaggac cactcctcga gacccatgag acgtaatcag tcgcagcctt gggcaggtta 6900

ggggaaggac cactcctcga gacccatgag acgtaatcag tcgcagcctt gggcaggtta 6960

ggggaaggac cactcctcga gacccatgag acgtaatcag tcgcagcctt gggcaggtta 7020

ggggaaggac cactcctcga gacccatgag acgtaatcag tcgcagcctt gggcaggtta 7080

ggggaaggac cactcctcga gacccatgag acgtaatcag tcgcagcctt gggcaggtta 7140

ggggaaggac cactcctcga gacccatgag acgtaatcag tcgcagcctt gggcaggtta 7200

ggggaaggac cactcctcga gacccatgag acgtaatcag tcgcagcctt gggcaggtta 7260

ggggaaggac cactcctcga gacccatgag acgtaatcag tcgcagcctt gggcaggtta 7320

ggggaaggac cactcctcga gacccatgag acgtaatcag tcgcagcctt gggcaggtta 7380

ggggaaggac cactcctcga gacccatgag acgtaatcag tcgcagcctt gggcaggtta 7440

ggggaaggac cactcctcga gacccatgag acgtaatcag tcgcagcctt gggcaggtta 7500

ggggaaggac cactcctcga gacccatgag acgtaatcag tcgcagcctt gggcaggtta 7560

ggggaaggac cactcctcga gacccatgag acgtaatcag tcgcagcctt gggcaggtta 7620

ggggaaggac cactcctcga gacccatgag acgtaatcag tcgcagcctt gggcaggtta 7680

ggggaaggac cactcctcga gacccatgag acgtaatcag tcgcagcctt gggcaggtta 7740

ggggaaggac cactcctcga gacccatgag acgtaatcag tcgcagcctt gggcaggtta 7800

ggggaaggac cactcctcga gacccatgag acgtaatcag tcgcagcctt gggcaggtta 7860

ggggaaggac cactcctcga gacccatgag acgtaatcag tcgcagcctt gggcaggtta 7920

ggggaaggac cactcctcga gacccatgag acgtaatcag tcgcagcctt gggcaggtta 7980

ggggaaggac cactcctcga gacccatgag acgtaatcag tcgcagcctt gggcaggtta 8040

ggggaaggac cactcctcga gacccatgag acgtaatcag tcgcagcctt gggcaggtta 8100

ggggaaggac cactcctcga gacccatgag acgtaatcag tcgcagcctt gggcaggtta 8160

ggggaaggac cactcctcga gacccatgag acgtaatcag tcgcagcctt gggcaggtta 8220

ggggaaggac cactcctcga gacccatgag acgtaatcag tcgcagcctt gggcaggtta 8280

ggggaaggac cactcctcga gacccatgag acgtaatcag tcgcagcctt gggcaggtta 8340

ggggaaggac cactcctcga gacccatgag acgtaatcag tcgcagcctt gggcaggtta 8400

ggggaaggac cactcctcga gacccatgag acgtaatcag tcgcagcctt gggcaggtta 8460

ggggaaggac cactcctcga gacccatgag acgtaatcag tcgcagcctt gggcaggtta 8520

ggggaaggac cactcctcga gacccatgag acgtaatcag tcgcagcctt gggcaggtta 8580

ggggaaggac cactcctcga gacccatgag acgtaatcag tcgcagcctt gggcaggtta 8640

ggggaaggac cactcctcga gacccatgag acgtaatcag tcgcagcctt gggcaggtta 8700

ggggaaggac cactcctcga gacccatgag acgtaatcag tcgcagcctt gggcaggtta 8760

ggggaaggac cactcctcga gacccatgag acgtaatcag tcgcagcctt gggcaggtta 8820

ggggaaggac cactcctcga gacccatgag acgtaatcag tcgcagcctt gggcaggtta 8880

ggggaaggac cactcctcga gacccatgag acgtaatcag tcgcagcctt gggcaggtta 8940

ggggaaggac cactcctcga gacccatgag acgtaatcag tcgcagcctt gggcaggtta 9000

ggggaaggac cactcctcga gacccatgag acgtaatcag tcgcagcctt gggcaggtta 9060

ggggaaggac cactcctcga gacccatgag acgtaatcag tcgcagcctt gggcaggtta 9120

ggggaaggac cactcctcga gacccatgag acgtaatcag tcgcagcctt gggcaggtta 9180

ggggaaggac cactcctcga gacccatgag acgtaatcag tcgcagcctt gggcaggtta 9240

ggggaaggac cactcctcga gacccatgag acgtaatcag tcgcagcctt gggcaggtta 9300

ggggaaggac cactcctcga gacccatgag acgtaatcag tcgcagcctt gggcaggtta 9360

ggggaaggac cactcctcga gacccatgag acgtaatcag tcgcagcctt gggcaggtta 9420

ggggaaggac cactcctcga gacccatgag acgtaatcag tcgcagcctt gggcaggtta 9480

ggggaaggac cactcctcga gacccatgag acgtaatcag tcgcagcctt gggcaggtta 9540

ggggaaggac cactcctcga gacccatgag acgtaatcag tcgcagcctt gggcaggtta 9600

ggggaaggac cactcctcga gacccatgag acgtaatcag tcgcagcctt gggcaggtta 9660

ggggaaggac cactcctcga gacccatgag acgtaatcag tcgcagcctt gggcaggtta 9720

ggggaaggac cactcctcga gacccatgag acgtaatcag tcgcagcctt gggcaggtta 9780

ggggaaggac cactcctcga gacccatgag acgtaatcag tcgcagcctt gggcaggtta 9840

ggggaaggac cactcctcga gacccatgag acgtaatcag tcgcagcctt gggcaggtta 9900

ggggaaggac cactcctcga gacccatgag acgtaatcag tcgcagcctt gggcaggtta 9960

ggggaaggac cactcctcga gacccatgag acgtaatcag tcgcagcctt gggcaggtta 10020

Ala Lys Leu Gly Pro Arg Phe Pro Phe Gly Ser Asp Ser Thr Leu Ile
180 185 190

Asn Gly Leu Gly Arg Thr Thr Gly Ile Ala Pro Ser Asp Leu Ala Val
195 200 205

Ile Lys Val Thr Gln Gly Lys Arg Tyr Arg Phe Arg Leu Val Ser Leu
210 215 220

Ser Cys Asp Pro Asn His Thr Phe Ser Ile Asp Asn His Thr Met Thr
225 230 235 240

Ile Ile Glu Ala Asp Ser Ile Asn Thr Gln Pro Leu Glu Val Asp Ser
245 250 255

Ile Gln Ile Phe Ala Ala Gln Arg Tyr Ser Phe Val Leu Asp Ala Ser
260 265 270

Gln Pro Val Asp Asn Tyr Trp Ile Arg Ala Asn Pro Ala Phe Gly Asn
275 280 285

Thr Gly Phe Ala Gly Gly Ile Asn Ser Ala Ile Leu Arg Tyr Asp Gly
290 295 300

Ala Pro Glu Ile Glu Pro Thr Ser Val Gln Thr Thr Pro Thr Lys Pro
305 310 315 320

Leu Asn Glu Val Asp Leu His Pro Leu Ser Pro Met Pro Val Pro Gly
325 330 335

Ser Pro Glu Pro Gly Gly Val Asp Lys Pro Leu Asn Leu Val Phe Asn
340 345 350

Phe Asn Gly Thr Asn Phe Phe Ile Asn Asp His Thr Phe Val Pro Pro
355 360 365

Ser Val Pro Val Leu Leu Gln Ile Leu Ser Gly Ala Gln Ala Ala Gln
370 375 380

Asp Leu Val Pro Glu Gly Ser Val Phe Val Leu Pro Ser Asn Ser Ser
385 390 395 400

Ile Val Val Thr Phe Thr Ala Val Ala Asn Ile Pro Gly Phe Pro His
405 410 415

Pro Phe His Leu His Gly His Ala Phe Ala Val Val Arg Ser Ala Gly
 420 425 430

Ser Ser Val Tyr Asn Tyr Asp Asn Pro Ile Phe Arg Asp Val Val Ser
 435 440 445

Thr Gly Gln Pro Gly Asp Asn Val Thr Ile Arg Phe Glu Thr Asn Asn
 450 455 460

Pro Gly Pro Trp Phe Leu His Cys His Ile Asp Phe His Leu Asp Ala
 465 470 475 480

Gly Phe Ala Val Val Met Ala Glu Asp Thr Pro Asp Thr Lys Ala Ala
 485 490 495

Asn Pro Val Pro Gln Ala Trp Ser Asp Leu Cys Pro Ile Tyr Asp Ala
 500 505 510

Leu Asp Pro Ser Asp Leu
 515

<210> 3
 <211> 2527
 <212> ADN
 <213> Pycnopus cinnabarinus

<400> 3
 agatctccga accagaaatg cgattgcgtt caggcccaat taagaataaa gctgcgtcag 60
 ggcagcgacg tatcttgatc catcattgac tcaccggcat cggcgtcaac accaaagcaa 120
 gctcgtccca cccataggcg tgcaccggcc ggcgtgcgcc attgaggtac atgagcgggg 180
 cgaaagtccg ccattggtag ccctgtcgtg gacgcgcggc gatgaaacgt ttcccacat 240
 tgggaagaaa cgtctgcggc ccatcatccc ttcaccggat gacaaggcgg cgtcgcgcct 300
 ttgccgcaga ggccggcggg cgacatgcac agcgaaggtc cgttgcggat gggaagcagg 360
 caatcagtgg gtgtcctacg ccgccacgat ggtcggggag cgtaggcgcc ctcccataag 420
 gcggcaagca tcatgatgct ctccgattcg ggaagcctgg tgcgatgctg gagagactct 480
 ctccgagaga ccagtgtgcg caacgttcct ggcttgaag actttaagt gagtgtagaa 540
 gggcgagcag aggacgatca tcggattgca ggaaccatcg gcatcctcag cctgggaagg 600
 atggctcttg gtagacattc gcggaagggtg tcttagatgt gagcgggctt cttggatgat 660
 catgtcgtaa ctttttctga cctcgtcggg ggtacgcatg gcaggattga gcattacggt 720
 atgcctccca ttcataaacg ataaccctt ccttcagggt ggtcatctcc atagagcggc 780
 acgctotcaa ggcctagggt attcacacct ccttcgcaac atccctattc acggtgtctg 840

taaggaacga cttgtcatgg gatcacatga agtgcagcat actgttcgcc ggtctcgag 900
 tacagacgct agtacgggaa gtcgacatcc aagcgttcag tcaccacatg gcaaaaaagc 960
 tgcaccatac tctttatggg gagttgttcg tgagtgggat acagtcattc atgagggaat 1020
 gccacccgga taggggtgtg cgcccgcaat attcatcgcc tggcaatagt cgatgtgcgt 1080
 ccttgttcaa tgaatatcat gggtcacatg tggagacggg taaacagcgt tgactgtgaa 1140
 tccctgggtgt gtgttgggcc gaacaggtag gttgcaggaa caccaatatc tcttcggcag 1200
 cccagttctt tgcgagcggc acaggcaggc atcgcgcaac agatcccagc catccggcct 1260
 ctgacattcg ggatacctga agcccttcag gtacggagcg aagagggtgg ctctctgcag 1320
 cgattggcgg acggatagct gtatttcctc tctcaccatt gggaagatgt gaaaggctcc 1380
 atcatatagc ggctcaactc tacctcgaat gtccaaacac ggcgggaata cttatttatg 1440
 tggacaaggc cgagctatga tagcttgctc ccgaagttgg taagtccgc aatctgcggg 1500
 tcaggcaaca gtctcggaaa aataagaaga atattgtagg tgctgttagg cgtatcgccc 1560
 aaatgcgcac acacggaggc tttaggagat gaagcgcccg tgagcggtaa gggagttggg 1620
 tcaccgccc cccgaccgac tctctctctt tccagcatc atgtctcggc gcaaacttta 1680
 ccctctattg accaactcca cgagaaagca ggaacagctt cttgtctct catgacgtcc 1740
 gcaatccaga cccttagccg gttcggtact catcggtatc cctgcgcga tggtagtgga 1800
 gtcagcctgg ccagtgcgta gtcccgctct tcttgctgca ctagagaagc cccatgagac 1860
 agcggttttt gctttatttc tgctgtttct atagacacca taggggcaaa cgatcctgca 1920
 cgcccagagg tattgggctc gtcagattcc cagttttct cctcggtctg aatcggtgc 1980
 acggcagata aatcgcccg aaatgctata gcccttcata gccgctatg agagtgcga 2040
 aaggcttgtc agtcaggctg gtcgagtggt tctcaggaag agcgtcaact tcgcgcgaca 2100
 gccgcctttc agggcaagat agatcctccc atcatccct actgcgctca gcgccggtag 2160
 cgaacaattg acttaccgac atcctccggg acgcgcaaat gctgttcgac ggaacgtaat 2220
 cctcttcgct ccgcctcttt tcgctctcac gcattccgtg tggttcgcgc gacggccgct 2280
 catcaggacc agaccagtct caatgtctgg taccggcaca atggtgacac tgcggcaact 2340
 gagtaggtct ggtcactctg gtgcaccgtc gcttacgctg accttcggga tactgtcctg 2400
 cagacatctg gagcgccgtt ctttccctta gtataaatga tgtctgtccg caggtccttg 2460
 aagaccctc agtccctct tgggttttag gtcggacctg tccaccaaac cctctttct 2520

gctatgttgt attgaccagc gtctgcagaa gatgggcacg acgatgcgcc gagccggcca 360
 gtgtcgtcgg atgtccactg ttgaggccat ctttttgcta gacagacgga agagctttgg 420
 aggtgcgatt cctctacgaa tgggaagggg cttagatgga gagtgcacg tctgagctcc 480
 ccaacacgcc ttcccgagg gtgcgtctcc gcggacattc acctcagttc attgttctga 540
 cctgcctaatt tgtatagacc ggccaacaac cttgctgacg cccatcataa cagtgccctg 600
 cacagagcct tccactcag tcggcgctc cctcaatcaa tccactaac tcgccggctc 660
 tgcccttcg ccgctcgaca cgctcgttg aagagcccg gcacggcgct ccgctcccc 720
 cttccctccg cgctcgtcatg cacgcagcgt taatgttget gcaggcgagc cgtaagtata 780
 ttcaaaggcg tagcgaatga atagcaggcg cgcggggacc tggcacgcgc ggcatgaaca 840
 tgcagacttg ggtgacgata acttgaactc agacgcggcg aatgaatatc caaacgcgcg 900
 ggaagaaaat aatttacggg agcctcccca ggtataaaaag cccctcacco gctcactctt 960
 tctccagtcg aacaccccag ttcaactacc cagcccttcc ttcttcgct atccttcytt 1020
 acaacctgct cgc 1033

<210> 6
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Séquence artificielle

<220>
 <223> Amorce PCR

<400> 6
 caytggcayg grttcttcc 19

<210> 7
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Séquence artificielle

<220>
 <223> Amorce PCR

<400> 7
 gagrtggaag tcratgtgrc 20

<210> 8
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Séquence artificielle

<220>
 <223> Amorce PCR

<210> 9
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Séquence artificielle

<220>
 <223> Amorce PCR

<400> 9
 cgcagtattg cgtggagag

19

<210> 10
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Séquence artificielle

<220>
 <223> Amorce PCR

<400> 10
 gacatctgga ggcctgtc

19

<210> 11
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Séquence artificielle

<220>
 <223> Amorce PCR

<400> 11
 atcgaagggtt ccgatgactg acatgac

27

<210> 12
 <211> 5122
 <212> ADN
 <213> Séquence artificielle

<220>
 <223> Séquence du vecteur pEGT

<400> 12
 catgggatat cgcattgctg cagagctcta gactcgacgg gcccggtacc gcggccgcct 60
 taagacgcgt ggatccgcag gtgaacgcgc ctatcgggtg gatattcggg cgacgggagc 120
 ctccggcaatc tgagcctcgt tactgcctag caaattcgga atcccttoga tgtcataggg 180
 tcggggacaa gtgactgtct tgctacatac tccaagggtg tgactcattc cctcgataat 240
 gaacattgtt gttgttgttt gttctctatc cgctcagtca cgcgacccca cacgtgcatg 300
 gttgaacttc gccacgcaac aaccgcatga cgacatggcg aacctaaagta aaggctgagt 360
 cgtggactaa agcactccac ttacggcga ggatgccagt ctacgtcatg aatgaagcct 420

caggccccga agtaaggggg tacaaaagga gggtgaaagg tggacgtttt cttaccatoc	480
ttccacctcc cagaccacca tgccgggaat tcccagcttg ctcaaaaagg ttctgcccg	540
acgcccgcca aattccttcg aggtggcccc tatcgcatat atgcacgact tcaaaacatc	600
cattctatca ttttgggatc gtacaattat tagacatgtt gtacaacgtt acattccttt	660
cttcttttac tctcggcccc agtctatgta gaggtaaagt acaagcgctc aaaggatcag	720
gcacttagag cgcgcgctct tgcttcgccc cttagagcgc gccgtcctgc ttccgcccg	780
agacgagcag gtcgcagaca cggcgggagt agccccactc gttgtcgtac caggcaatga	840
gcttcacgaa gctcttgctg atcgcgatgc cggggatoga tccacgcgtc ttaaggcggc	900
cgcggtaccc cctcggaccc gtcgggcccgc gtcggaccgg cgggtgttgg cggcgtcgg	960
cagtctgct cctcggccac gaagtgcacg cagttgcgg ccgggtcgcg cagggcgaac	1020
tcccgcccc acggtgctc gccgatctcg gtcatggccg gcccgaggc gtcccggaag	1080
ttcgtggaca cgacctcca cactcggcg tacagctcgt ccaggccgcg caccacacc	1140
caggccaggg tgttgccgg caccacctgg tcttgaccg cgtgatgaa cagggtcacg	1200
tcgtcccgga ccacaccggc gaagtgcctc tccacgaagt ccggggagaa cccgagccg	1260
tcggtccaga actcgaccgc tccggcgacg tcgcgcggg tgagcaccgg aacggcactg	1320
gtcaacttgg ccatgcatgg tgatgggcat tatgtgtgat gggatgcgat gggagaggga	1380
agtgtcttgg atgggagtgc tggagaaaga gggagacggc gggcggcgcg ccttttatac	1440
ccacgccga aagatccgat cgatactgac aaaacgggat gaacacatcg gcggcgccct	1500
ggactgcgcg ccatctgcaa atgcccagcc agtcccgtcg ggcgccacca ccagccctgg	1560
tcgagtcctc ctcgagggcg acgtctctatt ctatccatgc gcgcaattgc aggtgcgcgg	1620
tcgaagaaca gtccttcgca gtccttctcg cacctgggct gcgacctgt ctacctctca	1680
tcctaaccctc tcgcgggctt cgcagtacag ttactaatct cacaccgaag aggtctctcg	1740
gccacctcc gatcccgagc acgttcctta catgccacag cgtcagaatt gaacacaatg	1800
cacgtcarat cagatccccg ggaattcgta atcatggcca tagctgtttc ctgtgtgaaa	1860
ttgttatccg ctcaaatc cacacaacat acgagccgga agcataaagt gtaaagcctg	1920
gggtgectaa tgagtgagct aactcacatt aattgogttg cgtcactgc ccgtttcca	1980
gtcgggaaac ctgtcgtgcc agctgcatta atgaatcggc caacgcgcgg ggagaggcgg	2040
tttgcatatt gggcgtctt cgccttctc gctcactgac tgcgtgcgt cggctgttcg	2100
accccgga caggtacccg ctccctccc aggtgata caggtatcca aggtatccg	2160
accccgga caggtacccg ctccctccc aggtgata caggtatcca aggtatccg	2220
accccgga caggtacccg ctccctccc aggtgata caggtatcca aggtatccg	2280

acgctcaagt cagaggtggc gaaacccgac aggactataa agataccagg cgtttccccc 2340
 tggaagctcc ctcggtgcgt ctctgttcc gacctgccg cttaccggat acctgtccgc 2400
 ctttctccct tcgggaagcg tggcgcttcc tcatagctca cgctgtaggt atctcagttc 2460
 ggtgtaggtc gttcgctcca agctggggtg tgtgcacgaa cccccgttc agcccgaccg 2520
 ctgcgcctta tccggttaact atcgtcttga gtccaacccg gtaagacacg acttatcgcc 2580
 actggcagca gccactggta acaggattag cagagcgagg tatgtaggcg gtgctacaga 2640
 gttcttgaag tgggtggccta actacggcta cactagaagg acagtatttg gtatctgcgc 2700
 tctgctgaag ccagttacct tcggaaaaag agttggtagc tcttgatccg gcaaacaaac 2760
 caccgctggt agcgggtggt tttttgtttg caagcagcag attacgcgca gaaaaaagg 2820
 atctcaagaa gatcctttga tcttttctac ggggtctgac gctcagtga. acgaaaactc 2880
 acgtaaggg attttggta tgagattatc aaaaaggatc ttcacctaga tctttttaa 2940
 ttaaaatga agttttaaat caatctaaag tatatatgag taaacttggc ctgacagtta 3000
 ccaatgctta atcagtggag cacctatctc agcgatctgt ctatttcgtt catccatagt 3060
 tgcctgactc cccgtcgtgt agataactac gatacgggag ggcttaccat ctggccccag 3120
 tgctgcaatg ataccgcgag acccagctc accggtcca gatttatcag caataaacca 3180
 gccagccgga agggccgagc gcagaagtgg tctgcaact ttatccgct ccatccagtc 3240
 tattaattgt tgccgggaag ctgagtaag tagttcgcca gtaaatagtt tgcgcaacgt 3300
 tgttgccatt gctacaggca tcgtgggtgc acgctcgtcg tttggtagg cttcattcag 3360
 ctccggttcc caacgatcaa ggcgagttac atgatcccc atgttggtgca aaaaagcgg 3420
 tagctccttc ggtcctccga tcgttgctag aagtaagttg gccgcagtgt tatcactcat 3480
 ggttatggca gactgcata attctcttac tgtcatgcca tccgtaagat gcttttctgt 3540
 gactggtag tactcaacca agtcattctg agaatagtgt atgcggcgac cgagttgctc 3600
 ttgcccggcg tcaatacggg ataataccgc gccacatagc agaactttaa aagtgtcat 3660
 cattggaaaa cgttcttcgg ggcgaaaact ctcaaggatc ttaccgctgt tgagatccag 3720
 ttogatgtaa cccactcgtg caccctaactg atcttcagca tcttttactt tcaccagcgt 3780
 ttctgggtga gcaaaaacag gaaggcaaaa tgccgcaaaa aagggaataa gggcgacacg 3840
 gaaatgttga atactcatac tottctttt tcaatattat tgaagcattt atcagggtta 3900
 ttgtctcatg agcggataca tatttgaatg tatttagaaa aataaaciaa taggggttcc 3960
 ggcacattt ccccgaaaag tgccacctga cgtctaagaa accattatta tcatgacatt 4020
 aacctataaa aataggcgta tcacgaggcc ctttcgtctc gcgcgtttcg gtgatgacgg 4080

tgaaaacctc tgacacatgc agctcccga gacggtcaca gcttgtctgt aagcggatgc 4140
 cgggagcaga caagcccgtc agggcgcgtc agcgggtgtt ggcgggtgtc ggggctggct 4200
 taactatgcg gcatcagagc agattgtact gagagtgcac catatgcggg gtgaaatacc 4260
 gcacagatgc gtaaggagaa aataccgcat caggcgccat tcgccattca ggctgcgcaa 4320
 ctgttgggaa gggcgatcgg tgcgggctc ttcgctatta cgccagctgg cgaaagggg 4380
 atgtgctgca aggcgattaa gttgggtaac gccagggttt tcccagtcac gacgttgtaa 4440
 aacgacggcc agtgccaagc ttgcatgcct gcaggctgac gaccgagcgc gcgccacca 4500
 gcctatcccg cgcgggtcgg gacccaaaat aagcgggcc cgcgcgcgc cgtcgggcca 4560
 gcgggtgtat ctacgaacgg aactgggagg cgactcgga gagtttggtt agaaagggga 4620
 acaccatcgc ggacggccca gtgctctggd cagctgagcg tgcatttgtt tcaattctga 4680
 cctgtggcat gtaagggaacg tgctcgggat cggagggtgg cgcgagagcc tcttcgggtg 4740
 gagattagta actgtactgc gaagccgcgg aggggttagg atgagaggta gacagggtcg 4800
 cagcccaggt gcgagaagga ctgcgaagga ctgttcttcg accgcgcacc tgcaattgcg 4860
 cgcatggata gaatagagcg tcgccctcga gggggactcg accagggtcg gtggtggcgc 4920
 ccgacgggac tggctgggca tttgcagatg gcgcgcagtc caggccgcgc ccgatgtgtt 4980
 catcccgttt tgtcagtatc gatcggatct ttcgggcgtg ggtataaaag cgcgccgcc 5040
 gccgtctccc tctttctcca gactcccat ccagagcact tccctctccc atcgcatccc 5100
 atcacacaat aatgcccac ac 5122

<210> 13

<211> 5490

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Séquence du vecteur pESC

<400> 13

agcttctccg gcccgaatc gaacggcagg atgtgtgggc gtgtccaata ttgccatgaa 60
 aatctgtcag aagtgaagcc tctcgtcacc ctgtacagct tcgctgagtt gaaaagcagg 120
 gttcatcttg ggctcactga tgcactgagc tcgaccggag aactaaatga ccagccggag 180
 tgttactaa cttaacgcgc ggtattcagg gcagcttctc tatgttgccg ctacgacgta 240
 gctcccgcc catgaacggg ggaacgggg aggggtgctg ttggtacgct ttacgtctg 300
 gctatctctg ctgacagcg gctgacgaa gctggtgagc cgtggtgagc cgtggtgagc 360
 gctggtgagc cgtggtgagc cgtggtgagc cgtggtgagc cgtggtgagc 420
 gctggtgagc cgtggtgagc cgtggtgagc cgtggtgagc cgtggtgagc 480
 gctggtgagc cgtggtgagc cgtggtgagc cgtggtgagc cgtggtgagc 540

gaacccgagc cggtcgggtcc agaactcgac cgtccggcg acgtcgcgcg cggtgagcac	2340
cggaaacggca ctggtcaact tggccatgca tggatgatggg cattatgtgt gatgggatgc	2400
gatgggagag ggaagtgtc tggatgggag tgctggagaa agagggagac ggcgggcggc	2460
gcgccctttta taccacgcc cgaaagatcc gatcgatact gacaaaacgg gatgaacaca	2520
tgggcgcgcg cctggactgc ggcgatctg caaatgccc gccagtcggc tgggcgcca	2580
ccaccagccc tggtcgagtc cccctcgagg ggcagctct attctatcca tgcgcgcaat	2640
tgcaggtgcg cggtcgaaga acagtccttc gcagtccttc tcgcacctgg gctgogaccc	2700
tgtctacctc tcatactaac cctccgagg ctccgagta cagttactaa tctcacaccg	2760
aagaggctct cgcgccaccc tccgatcccg agcacgttcc ttacatgcca cagcgtcaga	2820
attgaacaca atgcacgtca ratcagatcc ccgggaattc gtaatcatgg tcatagctgt	2880
ttcctgtgtg aaattgttat ccgtcacia ttccacacia catacgagcc ggaagcataa	2940
agtgtaaagc ctggggtgcc taatgagtga gtaactcac attaatgctg ttgcgctcac	3000
tgcccgcttt ccagtcggga aacctgtcgt gccagctgca ttaatgaatc ggccaacgcg	3060
cggggagagg cggtttgctg attgggctgt ctccgcttc ctgctcact gactcgctgc	3120
gctcggctgt tcggtgctg cgagcgggtat cagctcactc aaaggcggta atacggttat	3180
ccacagaatc aggggataac gcaggaaaga acatgtgagc aaaaggccag caaaaggcca	3240
ggaaccgtaa aaaggccgcg ttgtggcgt tttccatag gctccgccc cctgacgagc	3300
atcacaaaaa tcgacgtcga agtcagaggt ggcgaaaccc gacaggacta taaagatacc	3360
aggcgtttcc cctggaagc tccctcgtgc gctctcctgt tccgaacctg ccgcttaccg	3420
gatacctgtc cgcctttctc ccttcgggaa gcgtggcgct ttctcatagc tcacgctgta	3480
ggtatctcag ttcggtgtag gtcgttcgct ccaagctggg ctgtgtgcac gaacccccg	3540
ttcagcccga ccgctgcgcc ttatccggtg actatcgtct tgagtccaac ccggtgaagc	3600
acgacttctc gccactggca gcagccactg gtaacaggat tagcagagcg aggtatgtag	3660
gcggtgctac agagttcttg aagtgggtggc ctaactacgg ctacactaga aggacagtat	3720
ttggtatctg cgtctcgtg aagccagtta ccttcggaaa aagagttggg agctcttgat	3780
ccggcaaaca aaccacgct ggtagcgggtg gttttttgt ttgcaagcag cagattacgc	3840
gcagaaaaaa aggatctcaa gaagatcctt tgatcttttc tacggggtct gacgctcagt	3900
ggaacgaaaa ctacggttaa ggggttttgg tcatgagatt atcaaaaagg atcttcacct	3960
gacgctcttc aaactaaaaa tgaatttttc atctatcttc atctatcttc atcttaactt	4020
gacgctcttc aaactaaaaa tgaatttttc atctatcttc atctatcttc atcttaactt	4080
gacgctcttc aaactaaaaa tgaatttttc atctatcttc atctatcttc atcttaactt	4140
gacgctcttc aaactaaaaa tgaatttttc atctatcttc atctatcttc atcttaactt	4200

catctggccc cagtgtgca atgataccgc gagaccacg ctcaccggt ccagatttat 4200
cagcaataaa ccagccagcc ggaagggccg agcgcagaag tggtcctgca actttatccg 4260
cctccatcca gtctattaat tgttgccggg aagctagagt aagtagttcg ccagttaata 4320
gtttgcgcaa cgttgttgcc attgctacag gcatcggtgt gtcacgctcg tcgtttggta 4380
tggcttcatt cagctccggt tccaacgat caaggcgagt tacatgatcc cccatgttgt 4440
gcaaaaaagc ggtagctcc ttcggctctc cgatcggtgt cagaagtaag ttggccgag 4500
tggtatcact catggttatg gcagcactgc ataattctct tactgtcatg ccatcogtaa 4560
gatgcttttc tgtgactggt gagtactcaa ccaagtcatt ctgagaatag tgtatgcggc 4620
gaccgagttg ctcttgcccg gcgtaatac gggataatac cgcgccacat agcagaactt 4680
taaaagtgt catcattgga aaacgttctt cggggcgaaa actctcaagg atcttaccgc 4740
tggtgagatc cagttcgatg taaccactc gtgcacccaa ctgatcttca gcatctttta 4800
ctttcaccag cgtttctggg tgagcaaaaa caggaaggca aaatgccgca aaaaaggga 4860
taaggcgac acggaatgt tgaatactca tactcttct tttcaatat tattgaagca 4920
tttatcaggg ttattgtctc atgagcggat acatatttga atgtatttag aaaaataaac 4980
aaataggggt tccgcgcaca tttcccgaa aagtgccacc tgacgtotaa gaaaccatta 5040
ttatcatgac attaacctat aaaaataggc gtatcacgag gccctttcgt ctgcgcggtt 5100
tcggtgatga cggtgaaaac ctctgacaca tgcagctccc ggagacggtc acagcttgtc 5160
tgtaagcgga tgccgggagc agacaagccc gtcagggcgc gtcagcgggt gttggcgggt 5220
gtcggggctg gcttaactat gcggcatcag agcagattgt actgagagt caccatatgc 5280
gggtgtgaaat accgcacaga tgcgtaagga gaaaataccg catcaggcgc cattcgccat 5340
tcaggctgcg caactgttgg gaaggcgat cggtcgggc ctcttcgcta ttacgccagc 5400
tggcgaaagg gggatgtgct gcaaggcgat taagttgggt aacgccaggg ttttccagt 5460
cacgacgttg taaaacgacg gccagtgcc 5490

reçue le 16/02/04



BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI

cerfa
N° 11235*02

DÉPARTEMENT DES BREVETS

26 bis, rue de Saint Pétersbourg

75800 Paris Cedex 08

Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 94 86 54

DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S) Page N° 1./2.
(Si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 113 W / 260899

Vos références pour ce dossier (facultatif)		IFB 03 DH INR ORUS	
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL		0400366	
TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum) PROCEDE DE SURPRODUCTION D'UNE PROTEINE RECOMBINANTE DETERMINEE PAR DES SOUCHES MONOCARYOTIQUES DE P. CINNABARINUS			
LE(S) DEMANDEUR(S) : INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE 147, rue de l'Université, 75338 PARIS CEDEX 07, FRANCE UNIVERSITE DE PROVENCE 3, Place Victor Hugo, F-13331 MARSEILLE CEDEX 3, FRANCE BIOMADE TECHNOLOGY FOUNDATION Nijenborgh 4, NL-9747 AG GRONINGEN, PAYS-BAS			
DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) : (Indiquez en haut à droite «Page N° 1/1» S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez un formulaire identique et numérotez chaque page en indiquant le nombre total de pages).			
Nom		ALVES	
Prénoms		Alexandra	
Adresse	Rue	Hemsterhuislaan 30,	
	Code postal et ville	9752	NE HAREN - Pays Bas
Société d'appartenance (facultatif)			
Nom		RECORD	
Prénoms		Eric	
Adresse	Rue	La Chloris, D, 13, boulevard du Redon	
	Code postal et ville	13009	MARSEILLE
Société d'appartenance (facultatif)			
Nom		LOMASCOLO	
Prénoms		Anne	
Adresse	Rue	Le Clos de la Bastide, B, 42, traverse le Mée.	
	Code postal et ville	13008	MARSEILLE
Société d'appartenance (facultatif)			

DATE ET SIGNATURE(S)

DU DEMANDEUR(S)

LE 16/02/2004

PAR LE DEMANDEUR(S)

Paris, le 16 FÉVRIER 2004

LE 16 FÉVRIER 2004



reçue le 16/02/04

BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI



N° 11235*02

DÉPARTEMENT DES BREVETS

26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08

Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 94 86 54

DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S) Page N° 2./2.
(Si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 113 W / 260899

Vos références pour ce dossier (facultatif)		IFB 03 DH INR ORUS	
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL		0400366	
TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum) PROCÉDE DE SURPRODUCTION D'UNE PROTEINE RECOMBINANTE DETERMINEE PAR DES SOUCHES MONOCARYOTIQUES DE <i>P. CINNABARINUS</i>			
LE(S) DEMANDEUR(S) : INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE 147, rue de l'Université, 75338 PARIS CEDEX 07, FRANCE UNIVERSITE DE PROVENCE 3, Place Victor Hugo, F-13331 MARSEILLE CEDEX 3, FRANCE BIOMADE TECHNOLOGY FOUNDATION Nijenborgh 4, NL-9747 AG GRONINGEN, PAYS-BAS			
DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) : (Indiquez en haut à droite «Page N° 1/1» S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez un formulaire identique et numérotez chaque page en indiquant le nombre total de pages).			
Nom		SIGOILLOT	
Prénoms		Jean-Claude	
Adresse	Rue	Résidence Anémones Florales, 500, avenue Joseph Raynaud.	
	Code postal et ville	83140	SIX FOURS LES PLAGES
Société d'appartenance (facultatif)			
Nom		ASTHER	
Prénoms		Marcel	
Adresse	Rue	28, avenue Peymian	
	Code postal et ville	13600	LA CIOTAT
Société d'appartenance (facultatif)			
Nom		WÖSTEN	
Prénoms		Han A.B.	
Adresse	Rue	C. Huygenslaan 19	
	Code postal et ville	3705	SN ZEIST - Pays-Bas
Société d'appartenance (facultatif)			
DATE ET SIGNATURE(S) DU (DES) DEMANDEUR(S) OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire)		Paris, le 15 JANVIER 2004 Charles DEMACHY, Mandataire 422.5/PP170 	

La loi n°78-17 du 6 janvier 1978 relative à l'informatique, aux fichiers et aux libertés s'applique aux réponses faites à ce formulaire.
Elle garantit un droit d'accès et de rectification pour les données vous concernant auprès de l'INPI.